



**Universidad**  
Zaragoza

# OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS EN SUBPRODUCTOS DE FRUTAS TROPICALES PARA SU APLICACIÓN EN MATRICES ALIMENTARIAS



David Gimeno Martínez

Trabajo Fin de Máster

2014-2015

## AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar unas breves líneas para dar las gracias a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo:

En primer lugar a las directoras del trabajo Dra. Maria Eugenia Venturini y Dra. Rosa Oria, por guiarme para la consecución del mismo, darme la oportunidad de realizar con anterioridad el Trabajo de Fin de Grado y poder continuar trabajando en su laboratorio.

Gracias a todos los miembros del grupo de investigación y compañeros de laboratorio que han hecho aún más agradable si cabe el trabajo diario. En especial a Diego Redondo, por iniciarme en el mundo de los fenoles, y prestarme toda la ayuda que ha sido necesaria para realizar el trabajo sobre un tema que domina de largo.

También se merecen una mención especial mis padres, Miguel y M<sup>a</sup> José, que me han apoyado siempre en todos los proyectos que he emprendido. Gracias por los valores inculcados, perseverancia y comprensión, que aunque a veces creáis que no han calado en mí, me hacen ser mejor persona.

Lo que es aún más importante, quiero darte las gracias a ti, Laura, por ser la persona que me ha sufrido más de cerca durante todo este año, por apoyarme, no perder nunca la paciencia y saber sacarme una sonrisa en los momentos de más estrés. Gracias por todo, sin ti no sería lo mismo.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>1. <u>Introducción</u></b>	
<b>1.1. Subproductos agroalimentarios procedentes de las industrias del procesado</b>	<b>3</b>
1.1.1. Subproductos industriales de frutas tropicales	4
1.1.2. Valorización de los residuos de frutas tropicales	5
<b>1.2. Compuestos bioactivos presentes en frutas tropicales y la importancia de sus propiedades antioxidantes</b>	<b>7</b>
<b>1.3. Extracción de compuestos de interés funcional o tecnológico a partir de Subproductos de frutas tropicales</b>	<b>10</b>
1.3.1. Métodos de extracción convencionales y nuevas tecnologías aplicadas a la revalorización de subproductos	10
1.3.2. Optimización de la extracción de compuestos de interés mediante la metodología de superficie de respuesta	12
<b>2. <u>Objetivos</u></b>	<b>15</b>
<b>3. <u>Material y métodos</u></b>	
<b>3.1. Material vegetal</b>	<b>16</b>
<b>3.2. Reactivos</b>	<b>16</b>
<b>3.3. Cuantificación e identificación de los compuestos de interés</b>	
3.3.1. Extracción, cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos	
3.3.1.1. Preparación de los extractos	16
3.3.1.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales	18
3.3.1.3. Cuantificación de flavonoides	18
3.3.1.4. Identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC	18
3.3.2. Métodos para determinar la capacidad antioxidante	
3.3.2.1. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	19
3.3.2.2. FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Férrica)	20

<b>3.4. Optimización de la extracción de compuestos de interés mediante la metodología de superficie de respuesta</b>	<b>21</b>
3.4.1. Utilización de un modelo matemático para optimizar el método de extracción	21
3.4.2. Método de extracción	24
<b>3.5. Determinación de la capacidad inhibitoria de la oxidación en aceite en aceite de oliva como aplicación tecnológica de los extractos procedentes de subproductos de frutas tropicales</b>	<b>25</b>
<b>3.6. Análisis estadístico</b>	<b>26</b>
<b>4. <u>Resultados y discusión</u></b>	
<b>4.1. Cuantificación e identificación de los compuestos de interés presentes en Subproductos de frutas tropicales</b>	<b>27</b>
4.1.1. Cuantificación de compuestos fenólicos totales	27
4.1.2. Cuantificación de flavonoides totales	31
4.1.3. Identificación de los compuestos fenólicos mayoritarios	32
<b>4.2. Métodos para determinar la capacidad antioxidante de los extractos</b>	<b>34</b>
4.2.1. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	35
<b>4.3. Optimización de la extracción de compuestos de interés a partir de la Piel de rambután mediante la metodología de superficie de respuesta</b>	<b>36</b>
4.3.1. Identificación de los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en los extractos de la piel de rambután obtenidos mediante sistema Soxtec	45
4.3.2. Determinación de la capacidad inhibitoria de la oxidación en aceite de oliva de los extractos de piel de rambután por el sistema Soxtec	46
<b>5. <u>Conclusiones</u></b>	<b>48</b>
<b>6. <u>Bibliografía</u></b>	<b>50</b>

## **RESUMEN**

Las industrias transformadoras de frutas tropicales generan una gran cantidad de residuos (piel, semillas, huesos y cáscaras), que podrían ser revalorizados convirtiéndolos en subproductos. Así, se define valorización como todo procedimiento que permita el aprovechamiento de los recursos contenidos en los residuos, sin poner en peligro la salud humana y sin utilizar métodos que perjudiquen al medio ambiente. Por ello, se ha cuantificado el contenido en compuestos fenólicos y flavonoides totales, así como la actividad antioxidante de varios subproductos: piel y hueso de mango, piel de rambután, piel y corona de piña, piel de pitahaya, piel de plátano y cáscara de cacao. Aunque todos los extractos resultaron ser una fuente interesante de estos compuestos, la mayor concentración (10.943,4 mg ác. gálico/100 g p.s.), y actividad antioxidante (9.811,3 mg Trolox/100g p.s.) se obtuvo en la piel de rambután. Posteriormente se modelizó y optimizó su extracción con la metodología de superficie de respuesta (MSR). Las condiciones de extracción que maximizaban las respuestas analizadas fueron: solvente con 50% etanol:50% agua (v:v), 140°C durante 35 minutos. En estas condiciones las concentraciones y actividades obtenidas fueron 17.287,5 mg ác. gálico/100 g p.s., 3.197,3 mg catequina/100 g p.s., y 12.322,0 mg Trolox/100 g p.s., siendo el ácido gálico y elálgico los principales ácidos benzoicos presentes con 1.000 mg/100 g p.s. y 1.620 mg/100 g p.s., respectivamente. Por último, este extracto aumentó considerablemente el periodo de inducción de un aceite de oliva virgen sometido a una prueba de estabilidad acelerada, mostrando su potencial para ser aplicado como solución antioxidante en alimentos.

**ABSTRACT**

Tropical fruits processing companies produce a large amount of waste products (peels, seeds, kernels and rinds), which could be revalorized transforming them into by-products. Thus, valorisation is define as the procedure to recover the natural resources contained in by-products, without endangering human health nor damaging the environment. Therefore, the total phenolic and flavonoid content, as well as the antioxidant activity of some by-products (mango peel and kernel, rambutan peel, pineapple peel and crown leaf, pitahaya peel, banana peel and cocoa pod husk) have been investigated. Although all the extracts have been demonstrated to be an interesting source of bioactive compounds, the rambutan peel showed the highest level of phenolic compounds (10,943.4 mg gallic acid/100 g d.w.) and antioxidant activity (9,811.3 mg Trolox/100g d.w.). Afterwards, the extraction process was modeled and optimized using the response surface methodology (RSM). The conditions that maximize the responses were: 50% ethanol:water (v:v), 140°C, and 35 minutes. The extracts obtained under these conditions reported up to 17,287.5 mg gallic acid/100 g d.w., 3,197.3 mg catequina/100 g d.w., and 12,322.0 mg Trolox/100 g d.w., being gallic and ellagic acids the principal benzoic acids with 1,000 mg/100 g d.w. and 1,620 mg/100 g,d.w. respectively. Moreover, this extract significantly increases the induction period of virgin olive oil in an accelerated stability experiment, showing its potential as a food antioxidant.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Subproductos agroalimentarios procedentes de las industrias de procesado

Debido a la concienciación de la población sobre la ingesta en la dieta de alimentos saludables como frutas y hortalizas, la demanda de productos frescos mínimamente procesados, comúnmente denominados productos en IV gama, está creciendo, ya que son productos de conveniencia listos para el consumo. En el año 2010 el consumo de frutas y verduras en IV gama en España ascendió a 290,07 millones de kilos, es decir, el equivalente a 2,96 y 3,35 kilos per cápita, respectivamente (Martín Cerdeño, 2011). Actualmente, el hecho de que estos alimentos además de ser frescos, se presenten ya cortados y pelados incentiva su consumo, lo que implica un consiguiente aumento de los subproductos industriales generados. Además, a los subproductos de las industrias de procesado mínimo hay que añadir aquellos procedentes de las transformadoras, dedicadas por ejemplo, a la deshidratación, o a la producción de zumo, mermelada o pulpa congelada (*Figura 1.1.*).

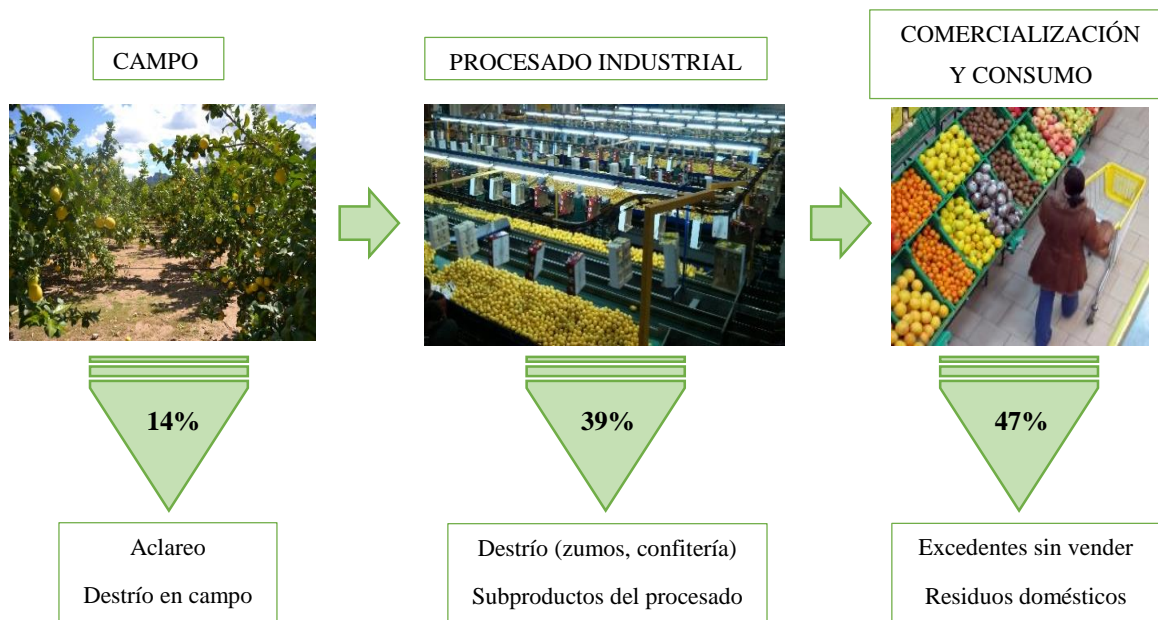


**Figura 1.1.** Diagrama de flujo de una industria transformadora dedicada a la producción de cubos de pulpa de mango congelados.

La Comisión Europea estimó que en 2006 el desperdicio de alimentos alcanzó los 89 millones de toneladas, el equivalente a 179 kg por persona, pudiendo aumentar hasta los 127 millones en 2020 si no se tomasen medidas al respecto (Monier, 2011). Aunque los residuos agroalimentarios se generan a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta el consumo en el hogar, el procesado industrial es uno de los principales puntos de producción, ya que acumula el 39% de los desechos generados



(Mirabella et al., 2014), y entre ellos, a aquellos de origen vegetal les corresponde una parte importante del problema. La *figura 1.2.* muestra los principales eslabones en los que se generan los residuos, su aportación a la producción global del sector alimentario, y algunas de las causas de su producción.



**Figura 1.2.** Eslabones de la cadena alimentaria en los que se producen la mayoría de los residuos agroalimentarios y principales causas implicadas.

Los subproductos vegetales están formados por las pieles, huesos, semillas y restos de pulpa, que normalmente son desechados por carecer de un uso posterior, y que pueden suponer hasta el 25-30% del alimento (Ajila et al., 2010; Ajila et al., 2007), siendo las pieles y semillas los más abundantes en las industrias de procesamiento mínimo. En general, todos estos subproductos han demostrado poseer elevadas concentraciones de compuestos fenólicos (Anastasiadi et al., 2010; Llorach et al., 2004; Mohdaly et al., 2013) que actúan como agentes antimicrobianos, antivirales o antiinflamatorios, además de presentar un alto poder antioxidante (Crozier et al., 2009; Ignat et al., 2011).

### 1.1.1. Los subproductos industriales de frutas tropicales

En el caso de las frutas tropicales, estos residuos generados por las industrias transformadoras son incluso de mayor volumen. Por ejemplo, los subproductos del mango, entre los que se encuentran la piel, el hueso y la semilla suponen el 60% del fruto (Dorta et al., 2014), la piel del maracuyá o fruta de la pasión alcanza el 50% del peso total del alimento, siendo totalmente desechada por las productoras de zumos (Kulkarni y



Vijayanand, 2010). Por otro lado, Ayala-Zavala et al. (2010) concluyen que, aunque la producción de subproductos sea variable, la proporción de papaya que se desecha respecto al porcentaje de producto final obtenido son prácticamente idénticas, llegando a ser superada en el caso de la piña, debido al gran volumen que suponen la corteza y la corona.

### **1.1.2. Valorización de los residuos de frutas tropicales**

En vista a los datos aportados, la valorización de los residuos orgánicos de origen vegetal parece ser una alternativa sólida a su aprovechamiento, que supondría una mejora medioambiental, además de económica para los productores, dando lugar a una gama más amplia de productos en el mercado. Así, se define valorización como todo procedimiento que permita aprovechar los recursos presentes en los residuos, sin comprometer la salud humana y sin utilizar métodos perjudiciales para el medio ambiente. Por lo tanto, el objetivo es lograr reducir al máximo el flujo de materia hacia vertedero o incineración, que aun siendo técnicas altamente contaminantes, se emplean mayoritariamente en muchos países europeos. De este modo se lograría transformar los residuos en subproductos con una nueva utilidad.

Son muchos los estudios que evidencian que la presencia de compuestos fitoquímicos es mucho mayor en la piel y la semilla respecto a las partes comestibles del fruto (Ayala-Zavala et al., 2010). Contreras-Calderon et al. (2011) estudiaron la composición de 24 frutas tropicales procedentes de Colombia y su relación con la capacidad antioxidante, diferenciando entre fruto entero, piel y semilla, llegando a la conclusión de que el contenido de estos compuestos en los subproductos era significativamente mayor que en las partes comestibles. Los resultados de Gonzalez-Montelongo et al. (2010) también muestran más concentración de compuestos antioxidantes en la piel que en la pulpa de plátano, resultados que concuerdan con los de Ribeiro da Silva et al. (2014) para distintas especies de frutas tropicales originarias de Brasil.

Principalmente, estos subproductos proceden de las industrias de procesado mínimo de frutas, fabricación de zumos y mermeladas. Los compuestos bioactivos presentes en estos residuos sugieren que son susceptibles de ser utilizados como conservantes de los propios alimentos de los que proceden, integrándose así en la producción, proporcionando

una alternativa natural frente al deterioro de los alimentos, y aumentando la sostenibilidad medioambiental de las empresas alimentarias (Ayala-Zavala et al., 2010).

Las estrategias para la recuperación de estos recursos se dividen en tres grandes grupos (Yepes et al., 2008):

### *1. Valorización química y biológica*

Dentro de este grupo se clasifican procesos biológicos como el compostaje o la lombricultura, y tecnologías para la extracción de distintos componentes fitoquímicos de interés funcional y tecnológico.

El compost es el resultado de la descomposición biológica de materia orgánica bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (50-70°C), cuya función es servir de abono para los cultivos (Yepes et al., 2008). La lombricultura es otra alternativa biológica para el aprovechamiento de los residuos orgánicos agrícolas, industriales y urbanos, basada en la utilización de la lombriz roja californiana como productora de hummus y proteína animal a partir de estos subproductos (Schuldt, 2006).

Por otro lado, estos subproductos vegetales son fuente de polisacáridos, como fibra, obtenida principalmente de las cortezas y pieles (Ajila et al., 2007; Yapo et al., 2013); enzimas útiles para la industria y con propiedades terapéuticas, como bromelaina (Kelly, 1996) y papaína (Mamboya, 2012); aceites esenciales; compuestos fenólicos, carotenoides y otros fitoelementos con propiedades funcionales (Jahurul et al., 2015).

### *2. Obtención de combustibles*

El biogás se obtiene de la descomposición de la materia orgánica por acción bacteriana o por su combustión en condiciones anaerobias, con el objetivo de producir energía térmica, eléctrica o como combustible (Abraham et al., 2007).

### *3. Valorización térmica*

En Europa actualmente el flujo de materiales residuales al vertedero o incineración es muy elevado. Esta técnica más que aportar un valor añadido, trata de eliminar los subproductos, con el inconveniente de que es altamente contaminante, ya que genera dioxinas y furanos, caracterizados por ser contaminantes orgánicos persistentes (COPs), y dióxido de carbono, contribuyendo al efecto invernadero.

La pirolisis es otro método térmico que emplea temperaturas entre 400 y 800°C para conseguir reducir el volumen de la materia hasta en un 95%, minimizando así la cantidad de residuos.

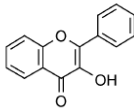
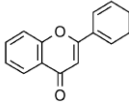
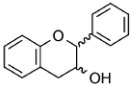
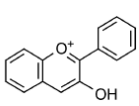
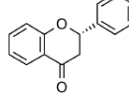
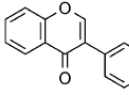
### **1.2. Compuestos bioactivos presentes en frutas tropicales y la importancia de sus propiedades antioxidantes**

Existen numerosos estudios epidemiológicos que evidencian que dietas ricas en frutas y otros vegetales pueden reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes en humanos (Crozier et al., 2009). Entre otros elementos, los compuestos fenólicos son los responsables de estos efectos terapéuticos. Se tratan de metabolitos secundarios ubicuos en las plantas cuyo interés está creciendo debido a sus propiedades bioactivas (Ignat et al., 2011), y que se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo. Aunque, por su estructura, todos ellos son susceptibles de secuestrar radicales libres, su actividad antioxidante puede variar mucho en función de la posición y el grado de hidroxilación, polaridad, solubilidad, estabilidad frente al procesamiento alimentario, y estabilidad de los propios radicales libres (Fennema, 2000). Se conocen más de 8000 estructuras diferentes, muchas de ellas presentes en los alimentos, que van desde los compuestos más sencillos de bajo peso molecular, hasta los más complejos, como taninos y fenoles derivados conjugados con azúcares o ácidos orgánicos (Crozier et al., 2009). Por norma general se clasifican en dos grandes grupos:

#### ***Flavonoides***

Son los compuestos fenólicos más abundantes en el reino vegetal, y se encuentran principalmente en las hojas y la piel de las frutas. Entre las propiedades funcionales que se les atribuyen, destaca su poder antioxidante y la inhibición del enzima convertidor de angiotensina (ACE) (Actis-Goretta et al., 2006; Crozier et al., 2009; Del Rio et al., 2013). Los compuestos más representativos de este grupo se detallan en la *tabla 1.1*.

**Tabla 1.1.** Estructura química de los principales flavonoides presentes en frutas.

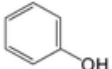
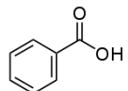
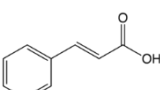
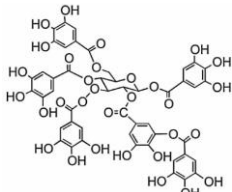
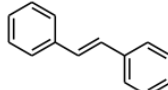
Clasificación	Estructura química	Principales compuestos	Fuentes
<b>Flavonoles</b>		Quercetina Miricetina Kaempferol	Manzana Judía Cebolla Endibia Granada
<b>Flavonas</b>		Luteolina Apigenina	Espinacas Perejil Apio Cítricos
<b>Flavan-3-ol</b>		Catequinas Proantocianidinas	Uva Manzana Arándano
<b>Antocianidinas</b>		Cianidina Pelagrnidina Delfinina	Mora Grosella Cereza Fresa Uva
<b>Flavanonas</b>		Naringenina Hesperidina Eriocitrina	Cítricos Tomate Menta
<b>Isoflavonas</b>		Genisteina Daidzeina	Soja

Fuentes: (Crozier et al., 2009; Del Rio et al., 2013; Ignat et al., 2011)

### ***Fenoles distintos de los flavonoides***

Este subgrupo está formado por una gran variedad de ácidos fenólicos y sus derivados, siendo el ácido gálico y elálgico los más comunes. Mayormente se encuentran esterificados con azúcares en forma de galotaninos y elagitaninos en fuentes diversas como fresas y frambuesas, granada, plátano, o nueces y avellanas, entre otros frutos. En la *tabla 1.2.* se detallan algunos ejemplos de ácidos fenólicos pertenecientes a la serie de los ácidos benzoicos y cinámicos, así como otros compuestos fenólicos distintos de los flavonoides, como los fenoles simples, taninos, y estilbenos.

**Tabla 1.2.** Clasificación de los compuestos fenólicos no flavonoides, estructura química y ejemplos de los compuestos más representativos.

Clasificación	Estructura química básica	Principales compuestos	Fuentes
<b>Fenoles simples</b>		<i>p</i> -cresol Hidroquinona Piroctecol	Tomate Coliflor Cítricos
<b>Ácidos benzóicos</b>		Ác. gálico Ác. elágico Vainillina Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico	Fresas Uva Cebolla Rábanos
<b>Ácidos cinámicos</b>		Ác. cafeico Ác. ferúlico Ác. clorogénico Ác. cumárico	Café Cereales Zanahoria Albaricoque
<b>Taninos</b>		Galotaninos Elagitaninos	Uva Granada Plátano Nueces
<b>Estilbenos y derivados</b>		Resveratrol Piceatanol	Uva Grosella Arándano

Fuentes: (Crozier et al., 2009; Del Rio et al., 2013; Ignat et al., 2011)

Aunque la cantidad de compuestos bioactivos depende, entre otros factores, de la variedad, grado de madurez, manejo precosecha, condiciones de almacenamiento y localización de los compuestos entre los distintos tejidos del fruto, las frutas tropicales se pueden considerar fuentes significativas de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante (Ajila et al., 2010).

Correia et al. (2012) identificaron quercetina, cianidina, proantocianidinas, y ácido elágico en varios residuos de frutas tropicales, presentándose este último en mayor concentración que en otros alimentos con reconocida cantidad de este compuesto como la fresa y productos derivados. Por otro lado, Ribeiro da Silva et al. (2014) cuantificaron niveles elevados de compuestos fenólicos y flavonoides, e identificaron determinados compuestos, como resveratrol y cumarina, en subproductos de guayaba, mango y papaya, entre otras frutas tropicales. Por último, Dorta et al. (2014) consiguieron separar hasta 30 compuestos fenólicos diferentes en subproductos de tres variedades diferentes de mango, entre los que destacan mangiferina, y derivados del ácido elágico y la quercetina.

Teniendo en cuenta las propiedades de estos compuestos, se postulan como posibles aditivos naturales para alargar la vida útil de algunos alimentos. Aunque en ocasiones

pueda resultar un atributo positivo para su flavor, las reacciones de oxidación de los lípidos forman moléculas volátiles que disminuyen la calidad de los alimentos por descomposición de los ácidos grasos que los forman, siendo una de las principales causas del deterioro de la calidad de alimentos grasos durante su procesado y almacenamiento (González-Montelongo et al., 2010). Además también influye en las reacciones de oxidación de pigmentos, provocando una pérdida de color y por consiguiente de la calidad organoléptica.

La cinética de oxidación lipídica de los alimentos muestra una fase de inducción seguida de un incremento exponencial de su velocidad. La duración de esta inducción es muy importante para los fabricantes de alimentos, dado que en este periodo la rancidez no se detecta, mientras que una vez que se ha alcanzado la fase exponencial, se desarrollan olores indeseables en muy poco tiempo (Fennema, 2000). Por esta razón, los compuestos antioxidantes naturales se presentan como alternativa para retrasar el periodo de inducción al máximo posible.

### **1.3. Extracción de compuestos de interés funcional o tecnológico a partir de subproductos de frutas tropicales**

El creciente interés de los consumidores por encontrar en el mercado ingredientes y alimentos naturales que sean saludables a la vez que seguros, además del beneficio económico que puede generar para empresas y productores, hace que en los últimos años se esté investigando profusamente la composición de los subproductos industriales de frutas tropicales, así como tecnologías para la optimización de la extracción de sus compuestos de interés.

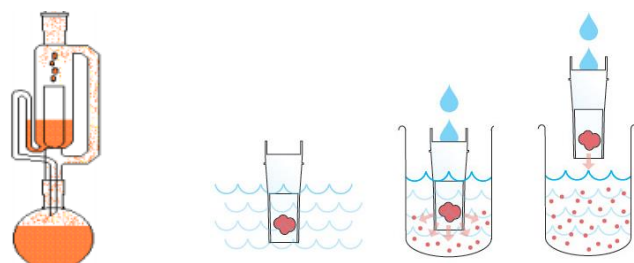
#### **1.3.1. Métodos de extracción convencionales y nuevas tecnologías aplicadas a la revalorización de subproductos**

Tradicionalmente la extracción de los compuestos de interés presentes en este tipo de matrices alimentarias se realiza utilizando disolventes orgánicos tales como agua, acetona, metanol, etanol o mezclas de estos últimos con distintas proporciones de agua (Contreras-Calderon et al., 2011; Iacopini et al., 2010; Llorach et al., 2004; Mohdaly et al., 2010). Esta extracción sólido-líquido consiste en un fenómeno de transporte de masa

en el que los sólidos contenidos en la matriz migran al solvente mientras están en contacto. Los distintos tratamientos de muestra previos (muestra fresca, desecada por aire o liofilizada), junto con la carencia de un método estandarizado para realizar esta etapa tan influyente en los resultados, provocan gran variabilidad entre autores, complicando su comparación.

Existen otros procedimientos para llevar a cabo la obtención de compuestos como la extracción en continuo con Soxhlet, sistema en el que se hace hervir el solvente de extracción y se pone en contacto con la muestra depositada en el cartucho Soxhlet, ya que los vapores del disolvente ascienden por el extractor y se condensan y se condensan en el refrigerante cayendo sobre el cartucho, pasando la parte soluble por gravedad al matraz (*Figura 1.3.*). Aunque se requieren grandes cantidades de solvente y se trata de un procedimiento largo, posee la ventaja de que siempre se está extrayendo con el disolvente puro en su punto de ebullición por lo que el rendimiento es máximo. Además, este sistema de extracción se ha implementado en un sistema semiautomático denominado Soxtec, que realiza la extracción en diferentes etapas: extracción, enjuague, y recuperación del solvente (*Figura 1.3.*), reduciendo el consumo de disolvente y el tiempo del proceso.

**Figura 1.3.** Esquema del método de extracción en una etapa (Soxhlet), izquierda, y del sistema Soxtec de extracción en varias etapas (ebullición, extracción y enjuague), derecha.



Por otro lado, es muy común la utilización de nuevas tecnologías aplicadas a la extracción de compuestos de interés de tejidos vegetales que faciliten la ruptura de las células o la transferencia de masa hacia el solvente. Cabe destacar el fenómeno de cavitación resultado del uso de ultrasonidos (Abbasi et al., 2008; Gonzalez-Centeno et al., 2014; Zhang et al., 2014), la electroporación provocada por los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) (Boussetta, Vorobiev, Le, et al., 2012; Boussetta, Vorobiev, Reess, et al., 2012), la extracción asistida con microondas (Gharekhani et al., 2012; Perino-Issartier et al., 2011), o la extracción con fluidos supercríticos como el dióxido de carbono (Abbasi et al., 2008; Garcia-Mendoza et al., 2015).

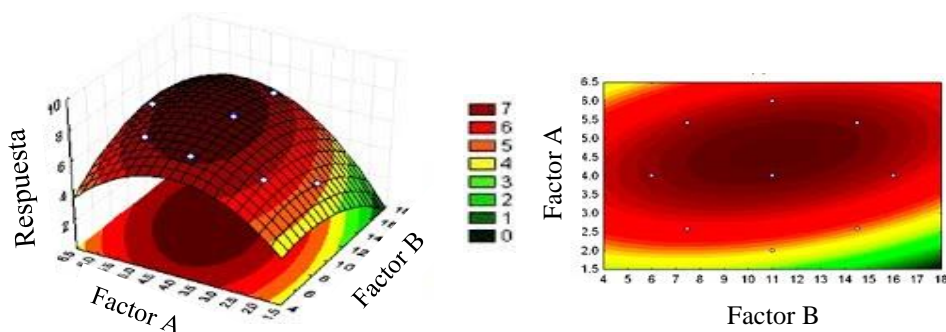


### **1.3.2. Optimización de la extracción de compuestos de interés mediante la metodología de superficie respuesta**

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas para modelizar y analizar los resultados obtenidos de un diseño experimental, que permite identificar las condiciones óptimas de las variables independientes para una variable respuesta determinada, realizando el mínimo número de experimentos posible (Hossain et al., 2011).

Box y Wilson (1951) fueron los primeros en introducir el diseño experimental y la metodología de superficie de respuesta, y desde entonces se ha utilizado ampliamente en la investigación de distintos procesos alimentarios, por ejemplo, en la molienda y fermentación, o para optimizar la extracción de compuestos de interés de células vegetales, tales como pigmentos y otros aditivos, proteínas, carbohidratos o compuestos con propiedades nutraceuticas. Dentro de este último grupo se encuentran los polifenoles, compuestos que han adquirido gran atención en la actualidad, debido a sus propiedades funcionales y estar presentes en una gran variedad de frutas y hortalizas. Además, como ya se ha venido diciendo, la concentración de estos fitoelementos es aún mayor en los subproductos derivados del procesado industrial, por lo que en este estudio se ha tratado de revalorizar ciertos subproductos de frutas tropicales extrayendo los compuestos de interés que nos brindan, y optimizar dicho proceso siguiendo las fases típicas de la metodología de superficie de respuesta:

- 1) La primera fase es un estudio preliminar donde se determinan las variables independientes y sus rangos de valores.
- 2) A continuación se selecciona el diseño experimental y la predicción y verificación del modelo matemático obtenido. Los diseños más comunes son de primer orden (factorial  $2^k$  o fracciones del mismo), o de segundo orden (composición central, Box-Behnken o Doherty).
- 3) Por último, se obtienen la ecuación que describe a variable dependiente, y los gráficos de superficie de respuesta y de contorno (*figura 1.4.*), que permiten determinar los puntos óptimos.



**Figura 1.4.** Gráfico tridimensional de superficie de respuesta y gráfico de contorno de la superficie de respuesta, de izquierda a derecha. Fuente: (Calderón, 2012).

Esta metodología ha protagonizado numerosos estudios de distinta índole, pero a modo de recopilación, en la *tabla 1.3.* se detallan distintos trabajos sobre la aplicación de la metodología de superficie de respuesta para el aprovechamiento de subproductos de frutas tropicales, optimizando el método de obtención de sustancias de interés a partir ellos.

**Tabla 1.3.** Recopilación de trabajos relacionados con la MSR y el aprovechamiento de subproductos de frutas tropicales.

Producto	Tejido	Compuestos	Proceso	Parámetros	Referencia
Guayaba	Subproducto puré	Compuestos fenólicos	Extracción sólido-líquido	pH Temperatura Tiempo	(K.-W. Kong et al., 2010)
Guayaba	Subproducto puré	Licopeno	Dsecación	Temperatura Tiempo	(K. W. Kong et al., 2010)
Granada	Piel	Compuestos fenólicos	Extracción sólido-líquido	Temperatura Tiempo	(Cam y Icyer, 2015)
Granada	Semilla	Aceite	Fluidos supercríticos	Presión Temperatura Flujo	(Liu et al., 2009)
Granada	Piel	Antioxidantes	Ultasonidos	% Etanol Temperatura Tiempo	(Tabaraki et al., 2012)
Mango marrón o bambangan	Piel	Compuestos fenólicos	Extracción sólido-líquido	% Etanol Temperatura Ratio	(Prasad et al., 2011; Prasad et al., 2012)
Plátano	Piel	Antioxidantes	Extracción sólido-líquido	Temperatura Tiempo Etapas	(González-Montelongo et al., 2010)
Maracuyá o fruta de la pasión	Piel	Pectinas	Precipitación química	Temperatura Tiempo Ratio	(Kulkarni y Vijayanand, 2010)

Las ventajas de la MSR residen en que ofrece una gran cantidad de información a partir de un número de experimentos limitado, por lo que supone un ahorro económico y temporal frente a las técnicas de experimentación clásicas. Por otro lado, además de conocer el comportamiento del sistema, permite observar la interacción de las variables independientes en la respuesta. Sin embargo, los modelos obtenidos se ciñen a las variables y rangos analizados, por lo tanto no se puede predecir el comportamiento del proceso fuera de ellas, ni concluir que este vaya a ser similar al modelo obtenido.

## **2. OBJETIVOS**

A lo largo de la sección anterior se ha constatado que la generación de residuos agroalimentarios supone un problema en la sociedad actual, y que por la cantidad que se genera, así como por su composición en fitoquímicos, el aprovechamiento de los subproductos de frutas tropicales como mango, cacao, plátano, pitahaya, piña o rambután, pueden suponer una mejora económica para las empresas, tanto social como medioambiental.

Por estas razones, este trabajo trata de caracterizar la composición en compuestos fenólicos de distintos residuos procedentes de frutas tropicales como la piel y hueso de mango, pericarpio o mazorca de cacao, piel de plátano, piel de pitahaya roja, piel y corona de piña, y piel de rambután, y obtener extractos ricos en estos compuestos que puedan tener una posible aplicación tecnológica. Para ello se han planteado una serie de objetivos parciales:

- 1) Cuantificar el contenido en compuestos fenólicos y flavonoides totales de los distintos subproductos, así como su capacidad antioxidante.
- 2) Identificar los fenoles mayoritarios presentes en los extractos mediante cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).
- 3) Evaluar y seleccionar el subproducto de mayor interés para optimizar su extracción mediante la metodología de superficie de respuesta, y conocer la máxima concentración de compuestos de interés que se pueden extraer con las condiciones más favorables.
- 4) Por último, determinar la eficacia de estos extractos para la inhibición de la oxidación lipídica, tomando como alimento modelo el aceite de oliva.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Material vegetal**

Los subproductos empleados en este estudio y la especie frutal de procedencia se detallan en la *tabla 2.1.* Todos ellos fueron suministrados por la empresa Phytone BV (Wageningen, Holanda), en estado deshidratado con diferentes tamaños de partícula. Para facilitar la posterior extracción fueron finamente particulados con ayuda de un molinillo (IKA-W; Staufen, Alemania).

#### **3.2. Reactivos**

Los principales reactivos empleados en este trabajo han sido:

Carbonato de sodio ( $\text{NaCO}_3$ ), nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ), cloruro de aluminio hexahidratado ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ), hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ), cloruro de hierro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ), metanol y etanol, todos ellos procedentes de Panreac Química S.L.U. (Barcelona, España). El radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ), y el ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox) utilizados fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), y el reactivo Folin-Ciocalteu por Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).

Todos los patrones de calibración (ácido gálico, ácido elágico, catequina, epicatequina, galocatequina, quercetina, vainillina, ácido ferúlico, ácido cumárico, y ácido clorogénico) también fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

#### **3.3. Cuantificación e identificación de los compuestos de interés**













##### **3.3.1. Extracción, cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos**

###### **3.3.1.1. Preparación de los extractos**

En esta primera etapa de caracterización de todos los subproductos, la extracción se llevó a cabo, por triplicado, a partir de 0,10 g de cada muestra en 10 mL de solución metanol:agua (80:20; v/v) que se homogeneizaron en tubos de centrífuga de 50 mL (Sarstedt Ag & Co.; Nümbrecht, Alemania) con la ayuda de un ultraturrax (IKA-W)

durante 2 minutos, y se centrifugaron posteriormente a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Por último, se trasvasaron los sobrenadantes a tubos Falcon de 15 mL (Sarstedt Ag & Co.) correctamente etiquetados, y una fracción de cada extracto, de 2 mL aproximadamente, se filtró en viales de cromatografía (Labbox; Barcelona, España) a través de un filtro de 45 µm (Macherey-Nagel GmbH & Co.; Düren, Alemania) para ser analizados por HPLC. Las muestras se guardaron en congelación (-32°C) hasta su análisis.

**Tabla 3.1.** Relación de los distintos subproductos utilizados en la obtención de los extractos y fruta tropical de la que proceden.

Fruta	Subproducto utilizado	Nombre científico	Origen	Principales cultivos
<b>Mango</b> 	<b>Piel y hueso</b> 	<i>Mangifera indica</i>	Noroeste de la India, norte de Burma, y Sri Lanka	México, India, Indonesia, Florida, Cuba, Hawái, Egipto, Sudáfrica, y Brasil
<b>Rambután</b> 	<b>Piel</b> 	<i>Nephelium lappaceum</i>	Malasia	Zonas de India, Tailandia, Indonesia, Costa Rica, Ecuador y Australia
<b>Cacao</b> 	<b>Mazorca</b> 	<i>Theobroma cacao</i>	América Latina	América del sur y central, el Caribe, África ecuatorial y sudeste asiático
<b>Plátano</b> 	<b>Piel</b> 	<i>Musa cavendishii</i>	Asia meridional	Latinoamérica y el Caribe, India, China, Indonesia, y Filipinas
<b>Pitahaya roja</b> 	<b>Piel</b> 	<i>Hylocereus ocamponis</i>	América central	Centroamérica, noreste de Sudamérica, y Vietnam
<b>Piña</b> 	<b>Mezcla de piel y corona</b> 	<i>Ananas comosus</i>	Brasil	China, Estados Unidos, Brasil, Tailandia, Filipinas, Costa Rica y México

Fuente: Elaboración propia con datos de FAOSTAT (2012), Torres et al. (1997), Batista (2009) e imágenes de <http://frutas.consumer.es/>.

#### 3.3.1.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales

Para determinar la concentración de compuestos fenólicos se modificó el método descrito por Singleton y Rossi (1965). En tubos de ensayo (Labbox) se colocaron 0,5 mL de cada extracto a los que se añadieron 0,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu. A continuación, se añadieron otros 0,5 mL de carbonato de sodio al 7,5%, y seguidamente 7 mL de agua destilada. Tras 60 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se determinó la absorbancia de la muestra a 760 nm utilizando un espectrofotómetro (Unicam; Waltham, USA). Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por 100 g de peso seco, considerando que es el fenol principal en todas las frutas.

La curva patrón se obtuvo a partir de soluciones estándar de ácido gálico (0-250 mg/l) preparadas en matraces de 10 mL (Labbox) que fueron sometidas al mismo proceso que las muestras para determinar su absorbancia.

#### 3.3.1.3. Cuantificación de flavonoides

El contenido en flavonoides del extracto se determinó modificando un ensayo colorimétrico descrito por Iacopini et al. (2010) en el que a 0,5 mL de extracto o solución estándar con concentraciones crecientes de catequina (0-150 mg/l) se añadieron 0,1 mL de nitrito de sodio al 5%. Transcurridos 5 minutos se adicionaron 0,1 mL de  $\text{AlCl}_3$  al 10%, y tras otro minuto se mezcló con 0,6 mL de NaOH 1 M. Por último, se midió la absorbancia de la mezcla a 510 nm y tras realizar los cálculos se expresó el contenido en flavonoides como mg de catequina en 100 g de peso seco.

#### 3.3.1.4. Identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC

Los fenoles se identificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un equipo serie 1100 (Hewlett-Packard Agilent; Santa Clara, USA) equipado con un degasificador, una bomba cuaternaria, un selector de muestras automático, un detector de matriz de fotodiodos (DAD) y una columna Zorbax SB-C18 de fase reversa (150 mm x 4,6 mm d.i.; tamaño de partícula 3,5  $\mu\text{m}$ ). Los resultados se analizaron con el software HP ChemStation 3365. Se empleó un método basado en el descrito por Tomás-Barberán et al. (2001) con pequeñas modificaciones. Como solvente A y B se utilizó



metanol y agua, respectivamente, ambos con 5% de ácido fórmico para mejorar la resolución de los picos (Tomás-Barberán et al., 2001). El flujo fue de 1 mL/min, aplicado según el siguiente gradiente: 95% de B desde 0 hasta 5 minutos, 95-88% de B desde 5 hasta 10 minutos, 88-75% de B desde 10 hasta 35 minutos, 75-50% de B desde 35 hasta 50 minutos, 50-20% de B de 50 a 52, y de 20-0% de B hasta 60 minutos. El volumen inyectado fue de 20 µL. El detector se fijó a longitudes de onda de 280 y 340 nm para analizar compuestos fenólicos pertenecientes a los ácidos benzoicos (ácido gálico y elágico, y vainillina), ácidos cinámicos (ácido ferúlico, cumárico y clorogénico), y flavonoides (catequina, quercetina, galocatequina y epicatequina). Todos los estándares de las curvas patrón se disolvieron en metanol:agua (80:20, v/v).

### 3.3.2. Métodos para determinar la capacidad antioxidante

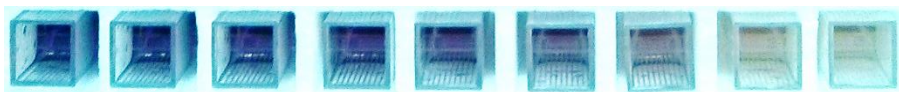
#### 3.3.2.1. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

El procedimiento operativo para la determinación colorimétrica de la capacidad antioxidante total se modificó del propuesto por Llorach et al. (2004). Se mezclaron 900 µL de los extractos fenólicos, en la correspondiente dilución (*Tabla 3.2.*), en cubetas de espectrofotometría (Sarstedt Ag & Co.) junto con 900 µL de solución de radical libre DPPH preparada con anterioridad pesando 0,0131 g (Mettler Toledo; Greifensee, Suiza) en un volumen total de 250 mL de metanol. Se agitó la mezcla y se incubó durante dos horas y media en oscuridad para que se desarrollase totalmente el color y medir la absorbancia a 515 nm.

**Tabla 3.2.** Diluciones realizadas para la curva de calibrado empleada en el método DPPH de determinación de la capacidad antioxidante.

Diluciones	1	2 (1/2)	3 (1/4)	4 (11/90)	5 (1/15)	6 (1/30)	7 (1/60)
Muestra (µL)	900	450	225	110	60	30	15
MeOH:H <sub>2</sub> O (µL)	-	450	675	790	840	870	885
DPPH (µL)	900	900	900	900	900	900	900

La curva patrón (*Figura 3.1.*) se preparó a partir de una solución madre de Trolox en metanol, que se diluyó 1/100 en metanol:agua al 80%. A partir de esta solución de trabajo se realizaron diluciones seriadas desde 0 hasta 60  $\mu\text{M}$ , a las que se añadieron 900  $\mu\text{L}$  de DPPH para obtener la curva de calibrado tras el periodo de incubación.

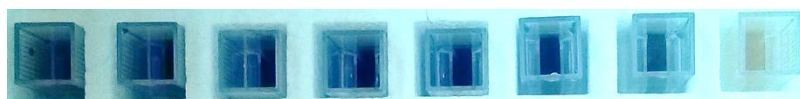


**Figura 3.1.** Curva patrón de Trolox para el método DPPH.

#### 3.3.2.2. FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Férrica)

Se desarrolló un procedimiento de trabajo a partir de los protocolos de Thaipong et al. (2006) y, Griffin y Bhagooli (2004), que consistía en añadir 900  $\mu\text{L}$  de reactivo FRAP junto con 120  $\mu\text{L}$  de muestra en cubetas de espectrofotometría, y medir la absorbancia de la mezcla a 595 nm, tras ser incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente.

El reactivo FRAP estaba formado por tampón acetato, TPTZ y  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  en proporción 10:1:1 (v:v:v). Se prepararon disolviendo: 0,1562 g de TPTZ en 2 mL de ácido clorhídrico y enrasando con agua hasta 50 mL, 0,2703 g de cloruro férrico en agua con ayuda de 1 mL de HCl en 50 mL, y 3,1 g de acetato de sodio trihidratado en 16 mL de ácido acético glacial y enrasando con agua hasta 1000 mL.



**Figura 3.2.** Curva patrón de Trolox para el método FRAP.

Para determinar las concentraciones finales de antioxidantes de las muestras se preparó una curva patrón de Trolox (*Figura 3.2.*). Para ello, se partió de 50 mL de una solución madre (1000  $\mu\text{M}$  en metanol:agua (80:20, v:v)). En la *tabla 3.3.* aparecen las distintas concentraciones usadas para realizar la curva de calibrado a partir de esta solución madre.

**Tabla 3.3.** Diluciones realizadas para la curva de calibrado empleada en el método FRAP de determinación de la capacidad antioxidante.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Solución madre Trolox (mL)	Metanol:agua 80:20 (mL)
1000	10	-
500	5,0	5,0
250	2,5	7,5
200	2,0	8,0
150	1,5	8,5
100	1,0	9,0
50	0,5	9,5
0	-	10

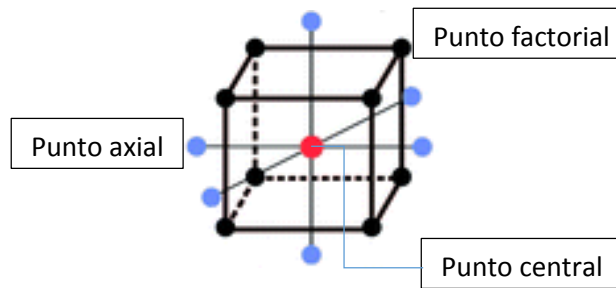
### **3.4. Optimización de la extracción de compuestos de interés mediante la metodología de superficie respuesta**

La piel del rambután fue el subproducto con una mayor concentración de compuestos de interés. Para optimizar la extracción de estos compuestos se trató de obtener un modelo matemático empleando la metodología de superficie de respuesta (MSR) utilizando el sistema Soxtec. En este caso, a las variables dependientes determinadas en la caracterización preliminar de los subproductos, se sumó la respuesta obtenida en la determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP.

#### **3.4.1. Utilización de un modelo matemático para optimizar el método de extracción**

Además de maximizar la eficiencia de la extracción, un objetivo parcial de este apartado fue reducir el impacto medioambiental producido por utilizar solventes orgánicos en los métodos de extracción a partir de tejidos vegetales. Por esta razón, y debido a su menor toxicidad, se empleó etanol como solvente. Su polaridad es ligeramente diferente, y aunque se han conseguido eficiencias de la extracción de compuestos fenólicos menores (Gonzalez-Montelongo et al., 2010; Martínez et al., 2012), también ha sido ampliamente utilizado en distintos frutos y tejidos vegetales (Khonkarn et al., 2010; Kim et al., 2010; Okonogi et al., 2007). Las variables independientes seleccionadas fueron las siguientes: porcentaje de etanol (0-80%), temperatura (80-140 °C), y tiempo de cada etapa de extracción, en un rango entre 15 y 45 minutos, tomando como referencia estudios anteriores realizados en nuestro grupo de investigación.

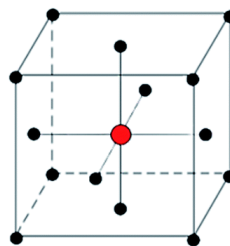
El diseño experimental y el análisis estadístico se realizó con el software Design-Expert 8 (Stat-Ease Inc.; Minneapolis, USA), proponiendo un diseño de composición central centrado en las caras, que presenta un entorno más acotado que otros diseños polinómicos de segundo orden, como el circunscrito o el inscrito, donde los puntos axiales toman valores situados a una distancia  $+\alpha/-\alpha$  del centro, por lo que también es conocido como diseño estrella (*Figura 3.3.*).



**Figura 3.3.** Representación gráfica del diseño de composición central circunscrito con 5 niveles por factor ( $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$ ).

En resumen, el diseño experimental seleccionado posee un número total de 20 combinaciones ( $N = 2^k + 2k + n_0$ ), cuyas condiciones de extracción se presentan en la *tabla 3.4.*, y está formado por los siguientes elementos (*Figura 3.4.*):

1. Diseño factorial  $2^k$  completo o diseño cúbico.
2. 6 réplicas del punto central ( $n_0 = 6$ ).
3. Dos puntos axiales en los ejes correspondientes a cada uno de los factores centrados en las caras ( $\alpha = 1$ ).



**Figura 3.4.** Representación gráfica del diseño de composición central centrado en las caras.

**Tabla 3.4.** Diseño experimental de las condiciones de extracción.

Ensayo	X <sub>1</sub> Etanol (%)	X <sub>2</sub> Temperatura (°C)	X <sub>3</sub> Tiempo (min)
1	80	80	15
2	0	80	15
3	0	110	30
4	0	140	45
5	80	140	45
6	80	110	30
7	40	140	30
8	40	110	30
9	0	80	45
10	40	110	30
11	40	110	15
12	40	110	30
13	40	110	30
14	40	110	30
15	0	140	15
16	40	80	30
17	80	140	15
18	80	80	45
19	40	110	45
20	40	110	30

La ecuación de la respuesta (Y) es una función de las variables independientes (Ec. 3.1):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i,j=1 \\ i \neq j}}^n \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Ec. 3.1})$$

donde n es un número entero,  $\beta_0$  es una constante,  $\beta_i$  es el coeficiente lineal,  $\beta_{ii}$  el coeficiente cuadrático, y  $\beta_{ij}$  el coeficiente de interacción, que fueron determinados mediante un análisis de varianza (ANOVA).  $X_i$  y  $X_j$  son los niveles de las variables independientes mientras que k es igual al número de factores testados, es decir,  $k = 3$ .

Por último, la estimación de la respuesta se calculó fácilmente mediante el uso del modelo, utilizando técnicas estadísticas con el programa Design-Expert 8. La significancia de los parámetros de la ecuación fue juzgada estadísticamente mediante un test de valor  $F$  con una probabilidad ( $p$ ) de 0,05. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

### 3.4.2. Método de extracción

Se utilizó una técnica de extracción convencional mediante soxhlet pero empleando el sistema Soxtec (Foss Tecator AB; Hognas, Suecia) dotado de regulador de tiempo y temperatura, con capacidad para procesar 6 muestras simultáneamente (*Figura 3.5.*). El equipo puede realizar cuatro fases (ebullición, enjuague, recuperación y pagado automático), aunque en este trabajo solo se emplearon las fases de ebullición y enjuague.



*Figura 3.5. Equipo empleado para realizar la extracción mediante sistema Soxtec.*

En cartuchos de celulosa (CHMLAB; Barcelona, España) de tamaño 33 mm x 80 mm se pesaron 0,25 g de piel de rambután desecada, se ajustaron al equipo, y se añadieron 50 mL de solvente. Tras la extracción, se trasvasaron los extractos a tubos Falcon, se enrasó a 50 mL con el mismo solvente y se analizaron directamente o fueron almacenados a -32 °C hasta su uso. Además, se obtuvieron unos extractos control en etanol:agua (80:20, v:v) según el procedimiento descrito en el apartado 3.3.1.1., para compararlos con los procedentes del sistema Soxtec.

Finalmente, una vez halladas las ecuaciones que describen la relación entre variables dependientes e independientes para cada factor, se determinaron las condiciones óptimas de extracción que hacen máxima cada una de las respuestas (concentración en fenoles totales, y flavonoides, capacidad antioxidante por el método DPPH, y FRAP) y se aplicaron para obtener un extracto óptimo por triplicado, y poder comprobar que las características se ajustasen a las estimadas por el modelo.

### **3.5. Determinación de la capacidad inhibitoria de la oxidación en aceite de oliva como aplicación tecnológica de los extractos procedentes de subproductos de frutas tropicales**

Una vez determinada la concentración en compuestos de interés y la capacidad antioxidante del extracto denominado óptimo, se comprobó su posible efecto en un estudio *in vivo* en una matriz alimentaria sobre la que los extractos obtenidos pueden tener una aplicación tecnológica.

Con el objetivo de determinar si existía inhibición de la oxidación de las grasas, este, y un extracto control obtenido por homogeneización convencional, fueron sometidos al método de medida de estabilidad oxidativa de aceites y grasas en condiciones aceleradas utilizando un equipo Rancimat® (*Figura 3.6.*) (Metrohm; Herisau, Suiza). Para ello, se mezclaron 3 gramos de aceite de oliva virgen con el volumen necesario del extracto control, y del óptimo para conseguir una concentración final de 0,007 mg de extracto/mL de aceite. Como blanco para determinar el factor de protección, se empleó aceite con un volumen de etanol equivalente al de los extractos añadidos a las muestras.

La oxidación acelerada se produjo a 121 °C con un flujo de aire de 20 l/h determinando los periodos de inducción (PI) necesarios. El efecto de las muestras en retrasar la oxidación del aceite se expresa como factor de protección (FP), calculado a partir de la siguiente fórmula (*Ec. 3.2*):

$$FP = \frac{PI \text{ extracto}}{PI \text{ control}} \quad (Ec. 3.2)$$

siendo PI extracto y PI control los tiempos de inducción de oxidación del aceite con y sin antioxidante, respectivamente.



**Figura 3.6.** Equipo Rancimat® utilizado en la determinación de la capacidad inhibitoria de la oxidación en aceite de oliva.



### **3.6. Análisis estadístico**

En la primera parte del estudio, centrada en la investigación de compuestos de interés en todos los subproductos de frutas tropicales con los que se ha trabajado, se han tratado estadísticamente los datos con el software SPSS 19.0. En primer lugar, se comprobó si los datos se ajustaban a una distribución normal mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov. Después, se aplicó un test ANOVA de un factor simultáneamente con la prueba de Levene para comprobar la homocedasticidad de los datos. A pesar de que seguían una distribución normal, al no existir homogeneidad entre las varianzas de las distintas variables y los tipos de subproducto, se rechazó este test, utilizando en su defecto el equivalente no paramétrico conocido como prueba de Kruskal-Wallis, acompañado del test de comparación múltiple Bonferroni, para conocer si existían diferencias significativas entre las medias de los distintos subproductos.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Cuantificación e identificación de los compuestos de interés presentes en subproductos de frutas tropicales

El objetivo de esta primera etapa del estudio fue determinar si alguno de los subproductos procedentes del procesado industrial de frutas tropicales podría considerarse una fuente interesante para obtener extractos con propiedades beneficiosas, tanto desde un punto de vista nutricional como tecnológico. Por ello se determinó el contenido en compuestos fenólicos y flavonoides totales, y se identificaron los principales mediante HPLC.

Ya existen numerosos estudios que consideran a muchas frutas y hortalizas, dependiendo de la especie, variedad y estado de maduración, como una fuente potencial de compuestos de interés (Iacopini et al., 2010; Marinova et al., 2005). Sin embargo, lo que parece aún más interesante, es que los subproductos hortofrutícolas procedentes de técnicas agrícolas y culturales, así como del procesado industrial de estos alimentos, presentan un contenido en polifenoles aún mayor que las fracciones destinadas al consumo humano. Tal es el caso de los procedentes de lechuga o achicoria (Llorach et al., 2004), piel de patata o pulpa de remolacha azucarera (Mohdaly et al., 2013; Mohdaly et al., 2010), entre otros.

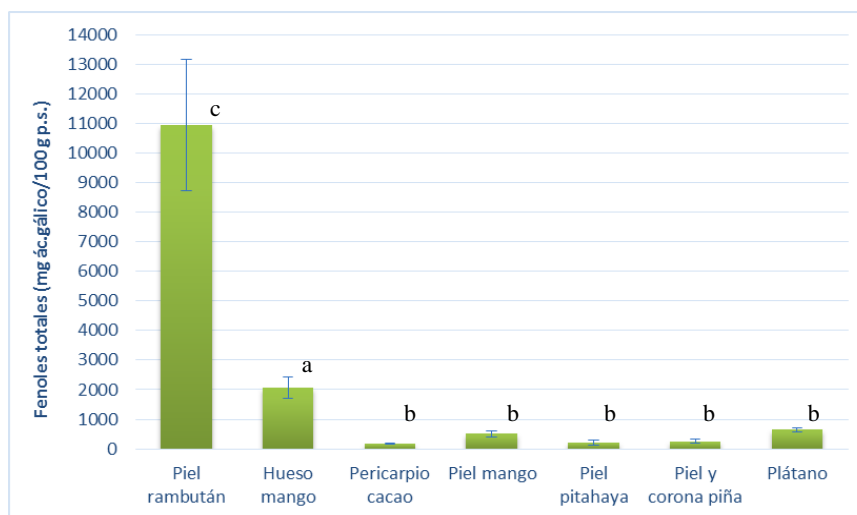
Concretamente, esta investigación se ha centrado en caracterizar la composición de extractos obtenidos a partir de subproductos, en este caso, de distintas frutas tropicales, en lo que respecta a su concentración en compuestos fenólicos y flavonoides totales, así como en identificar los compuestos mayoritarios presentes, y su relación con la capacidad antioxidante.

#### 4.1.1. Cuantificación de compuestos fenólicos totales

En la *figura 4.1.* se muestran los resultados obtenidos en la determinación de compuestos fenólicos totales para los extractos procedentes de subproductos del procesado de rambután, mango, cacao, pitahaya, piña y plátano. Resumiendo, se observa que la piel de rambután es un subproducto con alto contenido en estos compuestos, muy por encima del resto de tejidos analizados. Además, el análisis estadístico de los resultados muestra que, mientras los subproductos de cacao, pitahaya, piña, plátano, y

piel de mango no presentan diferencias significativas entre ellos, el contenido en compuestos fenólicos del hueso de mango es mayor.

Los resultados también muestran que la concentración de fenoles en los dos subproductos del procesamiento de mango estudiados, es diferente, y teniendo en cuenta que ambos suponen una fracción en peso del fruto importante, centrar las estrategias de revalorización sobre el hueso puede resultar en un mayor beneficio.



**Figura 4.1.** Contenido en compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/100 g p.s.) de los subproductos de rambután, mango, cacao, pitahaya roja, piña, y plátano. Las barras de error indican el intervalo de confianza de la media al 95%. Distintas letras indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ).

### Piel de rambután

Como puede observarse en la *figura 4.1.*, los extractos metanólicos obtenidos a partir de la piel de rambután desecada son los que mostraron una mayor concentración de compuestos fenólicos totales por 100 g de peso seco de subproducto. Este valor ( $10.943,4 \pm 2.228,3$  mg ác. gálico/100 g p.s.) concuerda con los obtenidos por otros autores (*tabla 4.1.*), concluyendo todos ellos en que el rambután presenta un elevado contenido en compuestos bioactivos en comparación con otras frutas tropicales, y que por su potencial funcional y tecnológico, sus subproductos requieren una atención e investigación más exhaustiva.

**Tabla 4.1.** Concentración de compuestos fenólicos totales halladas en distintos estudios en extractos obtenidos a partir de piel de rambután desecada.

Subproducto	Fenoles totales	Referencia
Piel de rambután	762 ± 10 mg GAE/ g extracto	(Palanisamy et al., 2008)
	104,6 mg GAE/ g peso seco	(Chunglok et al., 2014)
	542,2 mg catequina /g de extracto seco	(Thitilertdecha et al., 2008)

\*GAE: del inglés, equivalentes de ácido gálico.

### Hueso de mango

Distintos autores han encontrado concentraciones de fenoles en hueso de mango desde 112 (Abdalla et al., 2007) hasta los 44.760 mg ác. gálico/100 g p.s., que Dorta et al. (2014) obtuvieron mediante extracción asistida con microondas (MAE) en la variedad Keitt. Nuestros extractos muestran una concentración intermedia, con  $2.060,5 \pm 363,3$  mg ác. gálico/100 g p.s.

### Pericarpio de cacao

La concentración de fenoles totales en el pericarpio de cacao es de  $166,6 \pm 9,5$  mg ác. gálico/100 g p.s., significativamente menor que la obtenida por Martínez et al. (2012), que hallaron valores entre 352,67 y 365,33 mg ác. gálico/100 g p.s. tras la extracción con metanol:acetona. Este contenido puede variar dependiendo del solvente utilizado y los factores intrínsecos del propio fruto. Sin embargo, sigue siendo mayor que las concentraciones halladas en otros subproductos como la cáscara del grano de cacao o el mucílago de cacao, que se encuentran entre 80,17-144,83 mg ác. gálico/100 g p.s., y 102,00-182,63 mg ác. gálico/100 g p.s., respectivamente (Martínez et al., 2012). Así, la mazorca del cacao sigue siendo la fracción con más potencial de las resultantes del procesado industrial del cacao.

### Piel de mango

La composición de la piel de mango se ha estudiado con mayor profundidad que otros subproductos procedentes de este fruto, como el hueso o la semilla. Prueba de ello es la extensa cantidad de datos con los que comparar los resultados, de entre los que destacan los recogidos en la *tabla 4.2.* Entre los subproductos estudiados, es uno de los

que menos contenido en fenoles totales ha presentado,  $504,3 \pm 112,7$  mg ác. gálico/100 g p.s., siendo inferior a los obtenidos por la mayoría de los autores, pero significativamente superior al obtenido por Dorta et al. (2014).

**Tabla 4.2.** Concentración de compuestos fenólicos totales halladas por distintos autores en piel de mango desecada.

Subproducto	Fenoles totales (mg ác. gálico/100 g p.s.)	Referencia
Piel de mango	7.010-9.260	(Kim et al., 2010)
	5.467-10.970	(Ajila et al., 2007)
	5.467-9.020	(Ajila et al., 2010)
	47,83-79,53	(Dorta et al., 2014)

### Piel de pitahaya

La piel de pitahaya roja mostró un contenido en compuestos fenólicos totales de  $207,8 \pm 79,8$  mg ác. gálico/100 g p.s., no diferenciándose significativamente del resto de subproductos, a excepción del hueso de mango y la piel del rambután.

### Piel y corona de piña

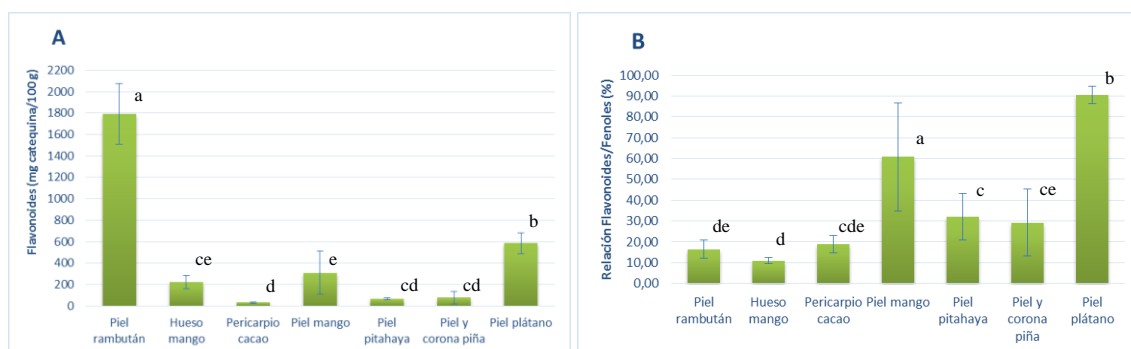
La concentración de compuestos fenólicos totales obtenida en el extracto de piel y corona de piña ( $256,9 \pm 80,6$  mg ác. gálico/100 g p.s.) concuerda con los resultados obtenidos por de Oliveira et al. (2009), que hallaron  $275 \pm 38$  mg ác. gálico/100 g p.s. en la piel procedente de la industria del zumo.

### Piel de plátano

En el plátano, Park et al. (2015) obtuvieron resultados para el fruto entero de  $160 \pm 16$  mg ác. gálico/100 g p.s., mientras que Gonzalez-Montelongo et al. (2010), analizando solo la piel, detectaron una concentración 10 veces superior, de  $1600 \pm 100$  mg ác.gálico/100 g p.s.. Aunque nuestros extractos tienen un menor contenido de compuestos fenólicos ( $646,13 \pm 77,65$  mg ác. gálico/100 g p.s), hay que tener en cuenta que, tanto en este como en todos los casos reseñados anteriormente, el solvente y sus proporciones, el protocolo de extracción seguido, el pretratamiento de la muestra, y el fruto influyen notablemente en los resultados obtenidos (Sulaiman et al., 2011).

#### 4.1.2. Cuantificación de flavonoides totales

La concentración de flavonoides (*Figura 4.2.A*), así como la relación entre ambos tipos de compuestos (*Figura 4.2.B*) nos pueden ayudar a la caracterización de la composición química y funcional de las muestras, por su estrecha relación con el poder reductor. Gran parte del interés de los compuestos fenólicos se centra sobre los flavonoides, ya que se encuentran entre las sustancias antioxidantes más potentes y efectivas presentes en los productos de origen vegetal (Palanisamy et al., 2008). Desafortunadamente, el ser humano es incapaz de sintetizarlos, por lo que deben ser ingeridos con la dieta o a través de suplementos alimenticios, derivando en una mayor demanda de estudios científicos sobre la composición y propiedades de determinados subproductos por parte del sector.



**Figura 4.2.** Contenido en flavonoides totales (mg catequina/100 g p.s.) (A) y relación (%) entre flavonoides y fenoles totales (B) en los subproductos de rambután, mango, cacao, pitahaya roja, piña y plátano. Las barras de error indican el intervalo de confianza de la media al 95%. Distintas letras indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ).

A pesar de que la piel del rambután fue el subproducto que mostró una mayor cantidad tanto de compuestos fenólicos totales como de flavonoides, se observa en la *figura 4.2.* que la relación entre ambos conjuntos de compuestos fue de las más bajas, tan solo del 17%. En el caso del mango se presentaron dos situaciones opuestas. En los extractos a partir del hueso se obtuvo una de las concentraciones de fenoles más elevadas, pero el contenido en flavonoides fue bajo, resultando en una relación entre ambos del 11%. Sin embargo, la piel de este fruto no resultó ser tan rica en compuestos fenólicos, pero el 61% de los mismos fueron flavonoides. Concretamente, la cantidad de flavonoides hallada en el hueso y la piel de mango, 225,0 y 309,9 mg catequina/100 g p.s.,

respectivamente, es mayor que la obtenida en otros estudios sobre los subproductos de frutas tropicales (Ribeiro da Silva et al., 2014).

El cacao es un producto que supone un gran aporte económico en muchas regiones del planeta, por lo que son numerosos los estudios realizados sobre su caracterización fenólica y funcional, así como del chocolate y otros productos derivados (Lecumberri et al., 2007; Othman et al., 2007; Wollgast y Anklam, 2000a). También han sido ampliamente estudiados los cambios composicionales que puede sufrir durante determinadas etapas del procesado, como la fermentación y el tostado (Wollgast y Anklam, 2000b). Sin embargo, para el caso de la mazorca de cacao no se han encontrado estudios que analicen la concentración en flavonoides totales, por lo que resulta difícil comparar los resultados obtenidos en este trabajo ( $31,70 \pm 7,16$  mg catequina/100 g p.s.).

En cuanto a los extractos obtenidos a partir de piel de pitahaya roja y los de la mezcla de piel y corona de piña presentaron contenidos en flavonoides totales similares, siendo de los menores entre los subproductos de las distintas frutas estudiadas. Además ambos extractos mostraron una relación entre fenoles y flavonoides totales del 30%, aproximadamente.

Por último, la concentración de flavonoides hallada en la piel del plátano fue de  $585,80 \pm 97,27$  mg catequina/100 g p.s., muy elevada en relación a la cantidad de fenoles totales hallada, lo que resulta en una proporción del  $90,61 \pm 4,09\%$ . Aunque, de igual modo que en el apartado 4.1.1.7., en el fruto entero la cantidad de flavonoides totales es menor que en la piel, también se puede decir que en ese caso la relación entre ambos compuestos es elevada (Park et al., 2015).

#### **4.1.3. Identificación de los compuestos fenólicos mayoritarios**

Tras la separación cromatográfica de los extractos de cada uno de los subproductos analizados mediante HPLC, se consiguieron identificar, en base a la información espectral de los patrones disponibles, algunos compuestos fenólicos individuales (*tabla 4.3.*). Sin embargo, no en todos los casos se pudo cuantificar la presencia de dichos compuestos. Además, no todos los picos cromatográficos pudieron ser identificados, y en caso afirmativo se requeriría una técnica más robusta de confirmación como la espectrometría de masas acoplada a HPLC.



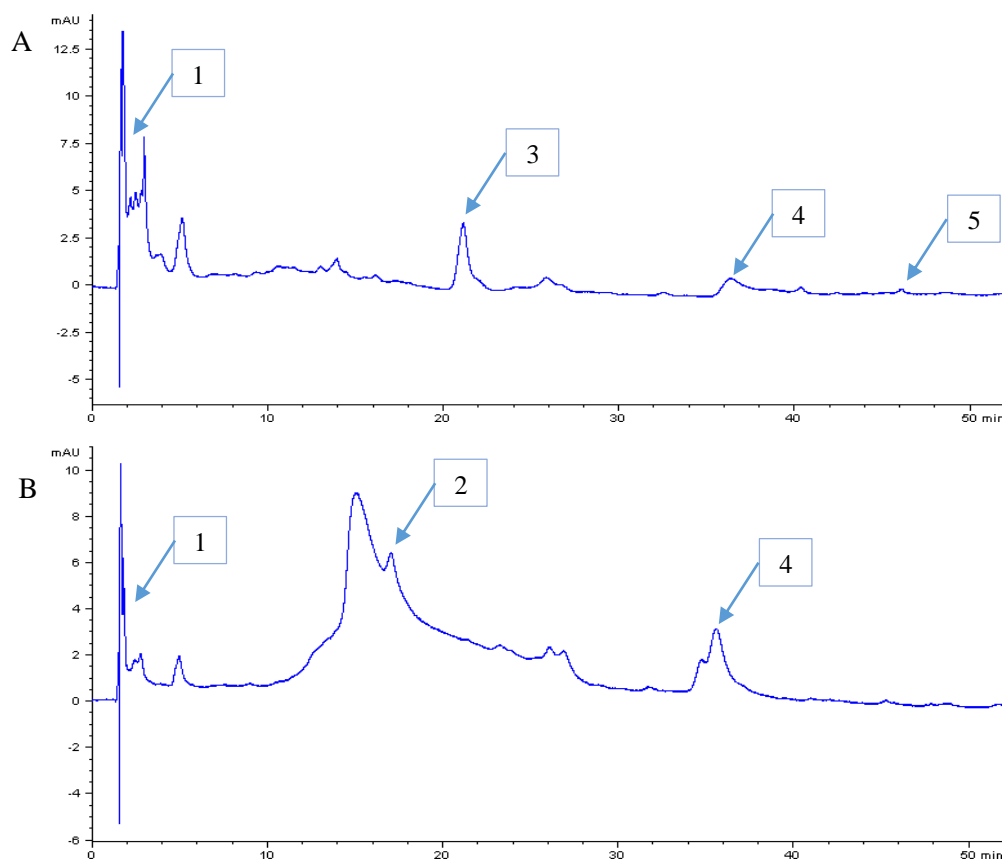
**Tabla 4.3.** Concentración de los compuestos fenólicos individuales identificados en los distintos extractos de subproductos de frutas tropicales, expresada como la media e intervalo de confianza al 95% en mg/g de peso seco de residuo. Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las concentraciones del compuesto principal cuantificado.

Subproducto	Compuesto	Concentración (mg/g)
<b>Hueso de mango</b>	Ácido elágico	$3,02 \pm 0,77$ a
	Ácido cumárico	$0,37 \pm 0,01$
	Quercetina	$0,041 \pm 0,003$
	Ácido gálico	Trazas
<b>Piel de rambután</b>	Ácido elágico	$4,23 \pm 0,68$ b
	Vainillina	$0,82 \pm 0,05$
	Ácido gálico	Trazas
<b>Pericarpio de cacao</b>	Catequina	$0,14 \pm 0,04$
	Galocatequina	Trazas
	Ácido gálico	Trazas
	Ácido elágico	Trazas
	Ácido clorogénico	Trazas
	Ácido clorogénico	Trazas
<b>Piel de mango</b>	Ácido clorogénico	Trazas
	Mangiferina	Trazas
	Lupeol	n.d.
<b>Piel de pitahaya roja</b>	Ácido elágico	$1,22 \pm 0,27$ c
	Ácido gálico	Trazas
	Ácido clorogénico	Trazas
<b>Piel y corona de piña</b>	Ácido gálico	Trazas
	Epicatequina	Trazas
<b>Piel de plátano</b>	Ácido gálico	Trazas
	Galocatequina	n.d.

\*n.d.: no detectado

La figura 4.3. muestra el perfil fenólico de los extractos de hueso de mango y piel de rambután, por ser aquellos en los que más compuestos se cuantificaron. Se observa que, aunque el ácido elágico es el mayoritario en ambos extractos, en la piel de rambután es significativamente superior.

A pesar de que la resolución de los picos cromatográficos es mejorable, se detectaron otros compuestos fenólicos representantes del grupo de los ácidos benzoicos, como la vainillina y el ácido gálico, en la piel de rambután y en ambos extractos, respectivamente. También se detectó la presencia de fenoles pertenecientes al grupo de ácidos cinámicos como el ácido cumárico en el hueso de mango, o flavonoides como la quercetina.



**Figura 4.3.** Cromatograma a 280 nm de los extractos de hueso de mango (A), y piel de rambután (B). 1: ácido gálico; 2: vainillina; 3: ácido cumárico; 4: ácido elágico; 5: quercetina.

#### 4.2. Métodos para determinar la capacidad antioxidante de los extractos

Los compuestos fenólicos se relacionan con la actividad antioxidante, ya que actúan como secuestrantes de radicales libres y quelantes de iones metálicos (Du et al., 2009; Jacob et al., 2008), además de ser capaces, a altas concentraciones, de neutralizar especies reactivas del oxígeno (Moongkarndi et al., 2004; Russo et al., 2005).

Para determinar esta capacidad se seleccionó el método del radical libre DPPH. Estos resultados, junto con los obtenidos en la cuantificación de compuestos de interés, nos permitirán seleccionar el subproducto más interesante desde un punto de vista funcional y tecnológico, con el que llevaremos a cabo los estudios para la optimización de la extracción.

#### 4.2.1. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Los resultados de la determinación del efecto de los extractos sobre el radical DPPH (tabla 4.4.) muestran que, de los subproductos analizados, el que posee una mayor capacidad antioxidante es la piel de rambután ( $9.811,3 \pm 1.244,4$  mg Trolox/100 g p.s.), siendo significativamente superior al resto. A pesar de que el resto de los extractos no mostró diferencias estadísticamente significativas en lo que respecta a su contenido en Trolox, compuesto escogido como modelo por sus similitudes con la vitamina E, se observa que ciertos subproductos pueden presentar mayor capacidad para contrarrestar la acción de los radicales libres. Esta propiedad aumenta cuanto mayor es la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la muestra, lo que concuerda con los resultados expuestos por Chunglok et al. (2014); Khonkarn et al. (2010); Malta et al. (2013); Thaipong et al. (2006) y Moo-Huchin et al. (2014).

**Tabla 4.4.** Capacidad antioxidante de los extractos de piel de rambután, pericarpio de cacao, mango, pitahaya roja, piña y plátano expresada como mg de Trolox por 100 g peso seco, media e intervalo de confianza al 95%. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Ensayo	Capacidad antioxidante (mg Trolox/100 g p.s.)
<b>Piel rambután</b>	$9.811,3 \pm 1.244,4$ c
<b>Pericarpio cacao</b>	$47,6 \pm 8,5$ b
<b>Hueso mango</b>	$1.490,5 \pm 282,0$ a
<b>Piel mango</b>	$202,9 \pm 112,0$ b
<b>Piel pitahaya</b>	$65,0 \pm 13,8$ b
<b>Piel y corona piña</b>	$56,16 \pm 23,66$ b
<b>Piel plátano</b>	$373,1 \pm 103,3$ b

Se ha podido vislumbrar a lo largo de la sección que resulta difícil consensuar los valores acerca del contenido de los compuestos de interés estudiados, tanto en las frutas, como en los propios subproductos en los que se centra este trabajo de investigación, ya que existen grandes discrepancias en la bibliografía consultada. Sin embargo, no se trata de un hecho aislado, ya que un análisis composicional tiene siempre un enfoque multivariable, es decir, son muchos los factores de los que depende, desde los intrínsecos o propios del fruto, como variedad o grado de madurez en el momento del ensayo, pasando por factores ambientales, como la zona geográfica del cultivo o la climatología, hasta aquellos pertenecientes al procedimiento de extracción (pretratamiento de la muestra, tipo de solvente, tecnología de extracción, temperatura, tiempo, o número de

extracciones). Por otro lado, se puede decir que ciertos subproductos, como la mazorca de cacao, piel y hueso de mango, piel y corona de piña, piel de plátano, de pitahaya roja, y de rambután parecen ser una fuente interesante de compuestos de interés para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, destacando este último por su elevado contenido en fenoles y flavonoides totales, razones por las cuales se seleccionó para realizar el estudio acerca de la optimización de la extracción.

Si comparamos su composición, y las propiedades antioxidantes que se derivan de esta, con extractos obtenidos de los subproductos de la industria vitícola (hollejos, semillas o sarmientos), muchos de los cuales ya se pueden encontrar formando parte de diversos productos en el mercado, se observa que la piel del rambután presenta un rendimiento hasta 100 veces mayor. Tal es el caso de los resultados obtenidos por Anastasiadi et al. (2010) en hollejos y semillas de distintas variedades de uva, que se hallan en un rango entre 90-351 mg ác. gálico/100 g p.s., y 825-2612 mg ác. gálico/100g p.s., respectivamente.

#### **4.3. Optimización de la extracción de compuestos de interés a partir de piel de rambután mediante la metodología superficie respuesta**

Este segundo enfoque abordado por el estudio, sobre la optimización de la extracción de compuestos fenólicos presentes en la piel de rambután utilizando el sistema Soxtec, se basó en un análisis ampliamente utilizado en el ámbito científico, como es la metodología de superficie de respuesta. El objetivo fue estimar cuan elevado sería el aprovechamiento de este subproducto si se sometiera la muestra a condiciones de extracción más favorables, y no tanto evaluar un posible escalado para una extracción industrial. Sin embargo, se modificó el protocolo de extracción respecto a la evaluación inicial de los distintos subproductos, por un lado, para mejorar su sostenibilidad empleando etanol como solvente, ya que actualmente es una premisa inherente a cualquier proceso, y por otro, facilitando la difusión de compuestos desde la matriz a dicho solvente por acción de la temperatura y tiempos de extracción más prolongados. Además, se introdujo el método de reducción férrica para determinar la capacidad antioxidante (FRAP), junto con el método del radical DPPH.

Para la consecución del objetivo se utilizó un diseño experimental de composición central que, por su fundamento estadístico, ha ayudado a conocer la influencia de las

variables estudiadas (proporción de solvente, temperatura y tiempo) en el proceso de extracción mediante el sistema Soxtec, realizando un número limitado de experimentos. A su vez, ha permitido profundizar en las interacciones entre los tres factores sobre las respuestas observadas (compuestos fenólicos y flavonoides totales, y actividad antioxidante por el método DPPH y FRAP) (*tabla 4.5.*).

La influencia de dichos factores se evaluó ajustando los datos experimentales a ecuaciones polinomiales de segundo orden según un modelo cuadrático. Los factores que no eran estadísticamente significativos ( $p > 0,05$ ) se eliminaron de cada respuesta mediante el procedimiento de regresión de eliminación hacia atrás. Estas ecuaciones (*Ec. 4.1 a Ec. 4.4*) permiten estimar las variables dependientes para cualquier valor de las condiciones de extracción dentro de los rangos estudiados.

$$Y_1 = 14.952,19 + 3.713,85 A + 1.772,10 B - 2.669,79 C^2 \quad (\text{Ec. 4.1})$$

$$Y_2 = 3.140,50 + 538,04 A + 337,40 B C - 1.172,52 A^2 \quad (\text{Ec. 4.2})$$

$$Y_3 = 13.858,60 - 6.959,43 A^2 \quad (\text{Ec. 4.3})$$

$$Y_4 = 24105,49 + 2701,43 A + 3814,61 B - 11675,95 A^2 \quad (\text{Ec. 4.4})$$

donde  $Y_1$  representa los compuestos fenólicos totales,  $Y_2$  los flavonoides totales,  $Y_3$  la capacidad antioxidante por el método DPPH, e  $Y_4$  la capacidad antioxidante por el método FRAP. A se corresponde con el solvente, B con la temperatura, y C con el tiempo de extracción.

**Tabla 4.5.** Diseño experimental y respuesta de las variables dependientes en la extracción de compuestos de interés de la piel de rambután por el sistema Soxtec.

Ensayo	Variables independientes			Variables dependientes			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>
<b>1</b>	80	80	15	16.816,3 ± 1.547,8	2.635,6 ± 413,3	7.170,8 ± 508,9	7.942,3 ± 97,0
<b>2</b>	0	80	15	7.217,5 ± 7.05,0	1.296,5 ± 410,0	9.562,6 ± 713,0	7.436,2 ± 699,6
<b>3</b>	0	110	30	9.775,5 ± 1.175,5	1.357,4 ± 146,5	6.097,9 ± 373,9	10.691,6 ± 5.718,2
<b>4</b>	0	140	45	12.238,3 ± 5.120,2	1.887,1 ± 426,6	4.471,3 ± 195,2	18.296,9 ± 1.912,4
<b>5</b>	80	140	45	15.878,3 ± 3.782,3	3.015,1 ± 195,4	8.635,7 ± 406,1	20.393,1 ± 4.352,2
<b>6</b>	80	110	30	20.098,5 ± 2.609,3	3.353,0 ± 40,5	7.819,9 ± 1.155,8	20.756,3 ± 3.822,2
<b>7</b>	40	140	30	18.894,4 ± 1.384,8	3.556,7 ± 298,7	13.733,3 ± 290,8	26.404,5 ± 194,0
<b>8</b>	40	110	30	16.883,8 ± 1.028,3	3.425,9 ± 6,4	12.272,2 ± 44,2	20.564,4 ± 1.551,2
<b>9</b>	0	80	45	5.619,0 ± 1.018,3	1.219,0 ± 196,9	5.150,8 ± 2.090,4	5.670,5 ± 1.847,0
<b>10</b>	40	110	30	8.960,9 ± 3.747,2	3.688,0 ± 728,9	13.751,4 ± 617,1	24.969,1 ± 97,0
<b>11</b>	40	110	15	14.153,4 ± 3.019,7	2.655,1 ± 168,3	9.758,0 ± 1.515,3	22.707,0 ± 4.306,1
<b>12</b>	40	110	30	14.172,1 ± 3.366,5	2.774,3 ± 35,3	12.711,0 ± 597,3	23.726,2 ± 5.136,3
<b>13</b>	40	110	30	15.634,0 ± 501,3	2.719,3 ± 143,1	12.443,3 ± 911,5	25.661,2 ± 1.955,7
<b>14</b>	40	110	30	13.574,4 ± 1.710,7	2.978,7 ± 428,3	14.935,0 ± 87,2	24.226,7 ± 3.104,4
<b>15</b>	0	140	15	8.387,4 ± 961,2	1.389,7 ± 361,0	3.573,9 ± 174,8	6.545,3 ± 379,2
<b>16</b>	40	80	30	12.300,7 ± 454,9	2.973,2 ± 133,0	12.119,9 ± 1.060,6	20.117,2 ± 1.750,7
<b>17</b>	80	140	15	15.929,6 ± 24,8	2.052,1 ± 30,4	8.080,1 ± 1.094,2	17.117,9 ± 183,7
<b>18</b>	80	80	45	11.653,6 ± 156,7	1.474,3 ± 7,2	6.488,4 ± 363,5	9.445,3 ± 279,8
<b>19</b>	40	110	45	14.930,6 ± 156,7	3.074,3 ± 148,1	13.576,0 ± 1.342,1	25.198,6 ± 2.052,2
<b>20</b>	40	110	30	19.227,5 ± 1.057,8	3.303,5 ± 81,0	15.790,3 ± 1.771,5	27.479,8 ± 167,2

X<sub>1</sub>: etanol (%); X<sub>2</sub>: temperatura (°C); X<sub>3</sub>: tiempo (min); Y<sub>1</sub>: fenoles (mg ácido gálico/100 g p.s.); Y<sub>2</sub>: flavonoides (mg catequina/100 g p.s.); Y<sub>3</sub>: capacidad antioxidante método DPPH (mg Trolox/100 g p.s.); Y<sub>4</sub>: Capacidad antioxidante método FRAP (mg Trolox/100 g p.s.). Resultados expresados como la media ± intervalo de confianza al 95%, en base seca de subproducto.

**Tabla 4.6.** Parámetros estadísticos de los factores que intervienen en el modelo matemático obtenido para el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante del extracto de la piel de rambután desecada mediante el sistema de extracción Soxtec.

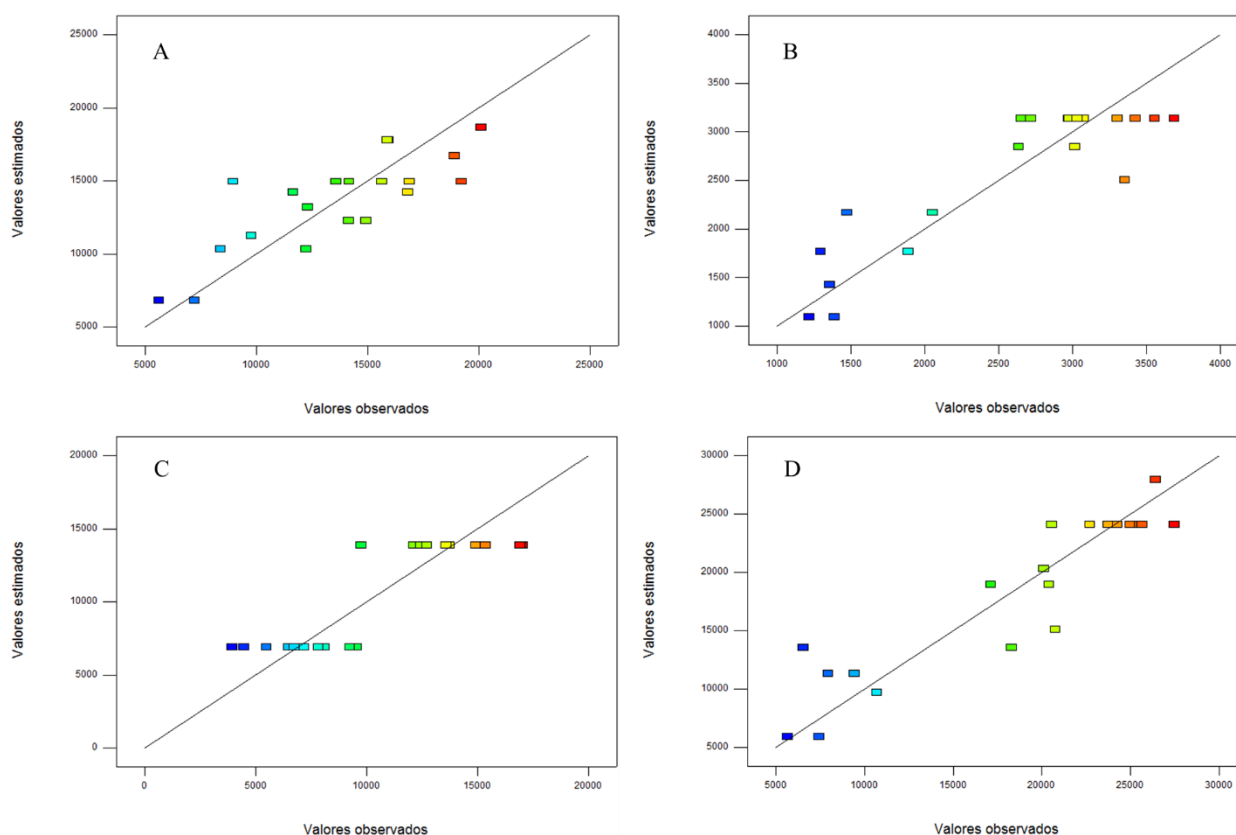
Factor	Y <sub>1</sub>		Y <sub>2</sub>		Y <sub>3</sub>		Y <sub>4</sub>	
	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p
<b>Modelo</b>	9,91	0,0006	21,13	<0,0001	56,05	<0,0001	30,09	<0,0001
<b>A</b>	20,00	0,0004	17,18	0,0008	-	-	7,32	0,0156
<b>B</b>	4,55	0,0487	-	-	-	-	14,59	0,0015
<b>C</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A<sup>2</sup></b>	-	-	40,80	<0,0001	56,05	<0,0001	68,35	<0,0001
<b>B<sup>2</sup></b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C<sup>2</sup></b>	5,17	0,0371	-	-	-	-	-	-
<b>A*B</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A*C</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>B*C</b>	-	-	5,40	0,0336	-	-	-	-
<b>Media</b>	13.617,29		2.554,24		10.378,89		18267,52	
<b>D.E.</b>	2.625,90		410,49		2078,67		3157,97	
<b>R<sup>2</sup></b>	0,650		0,798		0,757		0,849	
<b>R<sup>2</sup> ajus.</b>	0,585		0,761		0,743		0,821	
<b>C.V.</b>	19,28		16,07		20,03		17,29	
<b>F.A.</b>	0,37	0,9198	1,56	0,3262	1,14	0,4780	2,27	0,1881

A: solvente; B: temperatura; C: tiempo; C.V.: coeficiente de variación; F.A.: falta de ajuste. Y<sub>1</sub>: fenoles (mg ácido gálico/100 g p.s.); Y<sub>2</sub>: flavonoides (mg catequina/100 g p.s.); Y<sub>3</sub>: capacidad antioxidante método DPPH (mg Trolox/100 g p.s.); Y<sub>4</sub>: Capacidad antioxidante método FRAP (mg Trolox/100 g p.s.).

Tras realizar el análisis de varianza (*tabla 4.6.*) los valores de *p* inferiores a 0,05 indican que tanto los términos del modelo, como este mismo, son significativos, mientras que los factores que presentan valores superiores son eliminados del modelo, ya que siempre se tiende hacia una expresión matemática lo más simplificada posible. En el caso de los fenoles totales resultaron significativos los términos A, B y C<sup>2</sup>, es decir, el solvente y la temperatura influyeron linealmente sobre la extracción de compuestos fenólicos totales, mientras el tiempo de extracción presentó una interacción cuadrática. Por otro lado, para los flavonoides, el efecto del solvente es aún mayor ya que influye lineal y cuadráticamente, siendo este término aún más determinante que en el caso anterior (F = 40,80).

En cuanto a la capacidad antioxidante, se observó que el solvente al cuadrado fue el factor más influyente en ambos métodos (F = 56,05 y F = 68,35), siendo el único que resultó significativo en el modelo obtenido para el método DPPH.

La falta de ajuste determinada por el test ANOVA resultó no significativa para todas las respuestas, por lo que los modelos se ajustan a los resultados obtenidos. Sin embargo, los valores de  $R^2$  y  $R^2$  ajustado son bajos en todas las respuestas, por lo que existen diferencias en la distribución entre los valores estimados por el modelo y los experimentales, alrededor de la línea de equivalencia para cada respuesta (*Figura 4.3.*). La falta de homogeneidad en esta distribución se aprecia claramente en la *figura 4.3.C*, probablemente debido a la falta de términos en la ecuación que define la respuesta, ya que tan solo el factor solvente resultó significativo en la acción de los extractos sobre el radical DPPH, con una marcada influencia cuadrática.



**Figura 4.3.** Correlación entre los valores estimados y experimentales de las variables dependientes: fenoles totales (mg ác. gálico/100 g p.s.) (A); flavonoides totales (mg catequina/100 g p.s.) (B); capacidad antioxidante por el método DPPH (C) y método FRAP (D) (mg Trolox/100 g p.s.).

Las gráficas de superficie de respuesta obtenidas a partir de las ecuaciones que describen el comportamiento de la extracción en función de los parámetros estudiados (*Figura 4.4. a 4.7.*), ilustran la influencia de los factores para cada modelo sobre las respuestas evaluadas. En el caso de los fenoles totales (*Figura 4.4.*), se observa que tanto el efecto de la temperatura, como del solvente es lineal, siendo este último más

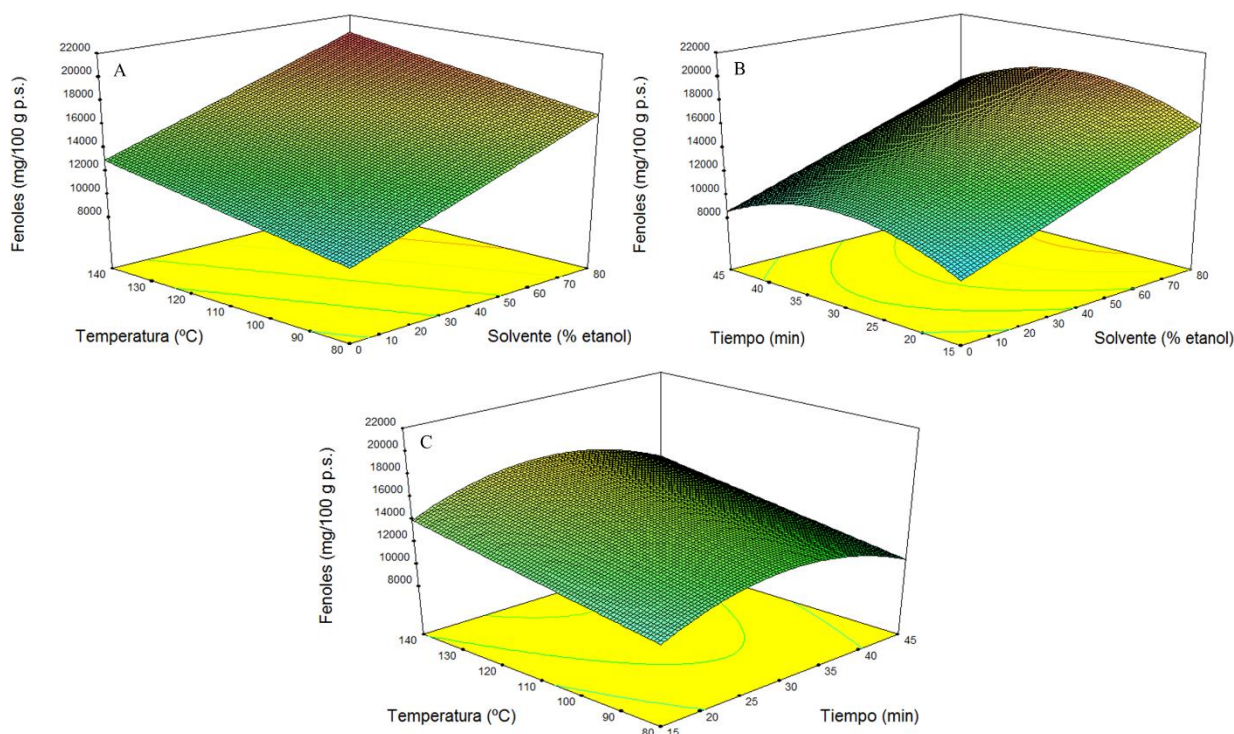


significativo, alcanzándose la máxima extracción con el 80% de etanol. Por el contrario, el tiempo de extracción tiene un comportamiento cuadrático sobre el contenido en compuestos conseguido, por lo que se logra una mayor cantidad de los mismos a los 30 minutos. Gong et al. (2012), estudiaron algunos parámetros para optimizar la extracción de compuestos bioactivos a partir de residuos de caléndula, y también obtuvieron que el rendimiento de la extracción disminuía a partir de cierto periodo de tiempo debido a la influencia cuadrática de esta variable. Spigno et al. (2007) también concluyen que tras periodos prolongados de extracción se produce un descenso en la cantidad de polifenoles extraídos de los hollejos de uva, bien por degradación de los mismos, o debido a fenómenos de polimerización que dan lugar a nuevos compuestos.

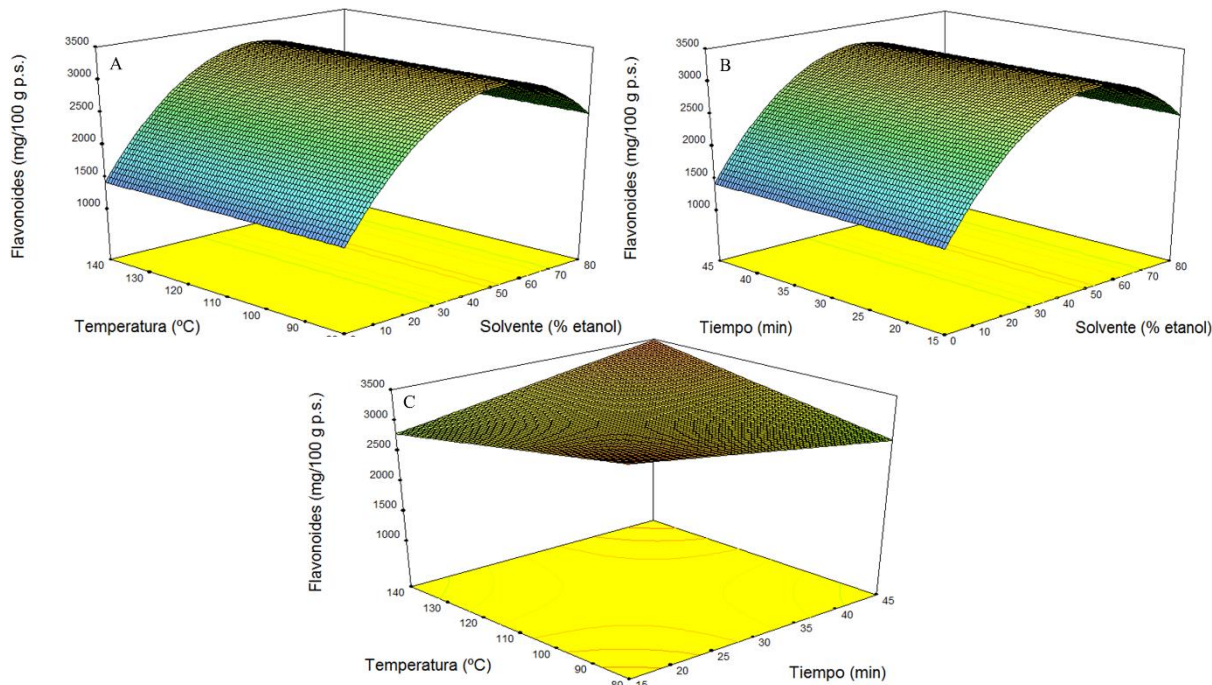
En la *figura 4.5.* se muestra el efecto de los factores sobre la eficiencia de la extracción de flavonoides totales, y cabe destacar la relación que se da entre las variables temperatura y tiempo. Paradójicamente, se obtiene mayor rendimiento a temperatura baja durante tiempos cortos, o con temperaturas altas durante tiempos más prolongados.

En la extracción de compuestos con actividad antioxidante frente al radical DPPH (*Figura 4.6.*) tan solo el solvente influye significativamente en el resultado. Su influencia es cuadrática, resultando en una mayor extracción entorno a una fracción de etanol del 40%, mientras que ni el tiempo ni la temperatura muestran efecto alguno sobre el contenido final de estos compuestos.

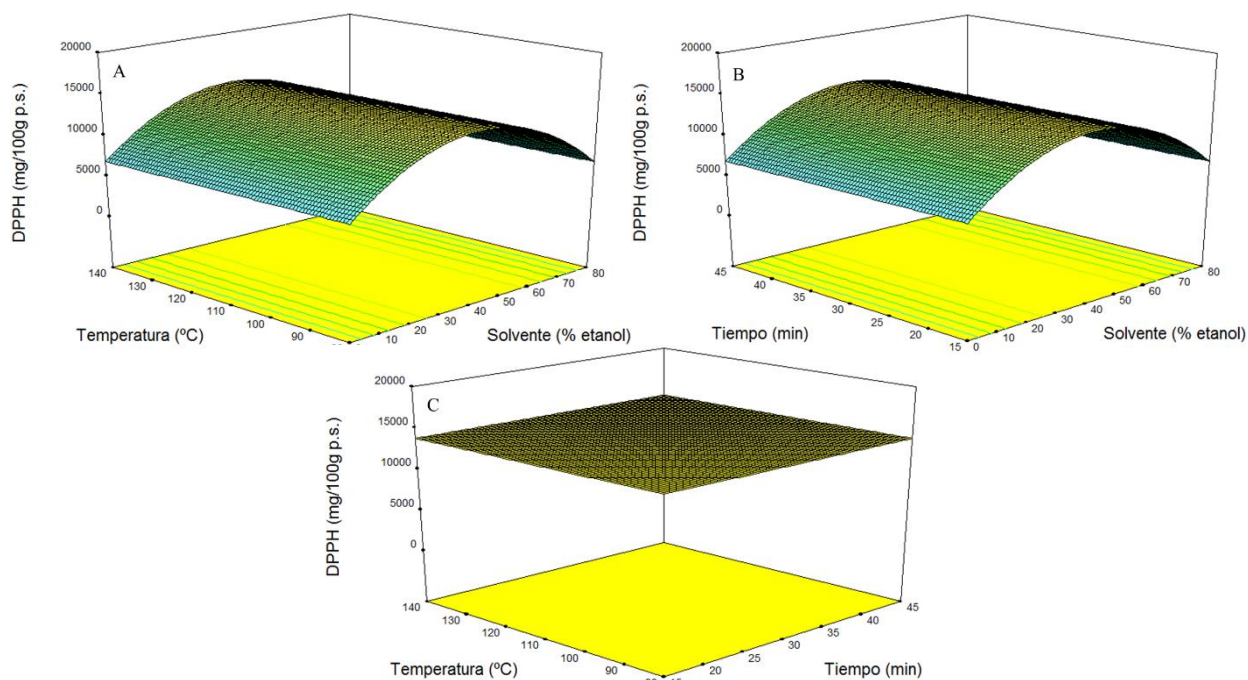
Por último, para el método FRAP (*Figura 4.7.*), la temperatura de extracción influye linealmente sobre la respuesta, pero el efecto del solvente es de mayor importancia. Su marcada relación cuadrática con la cantidad de antioxidantes hace que se alcancen los valores máximos alrededor del 40% de etanol, que se hace aún mayor al aumentar la temperatura hasta los 140°C.



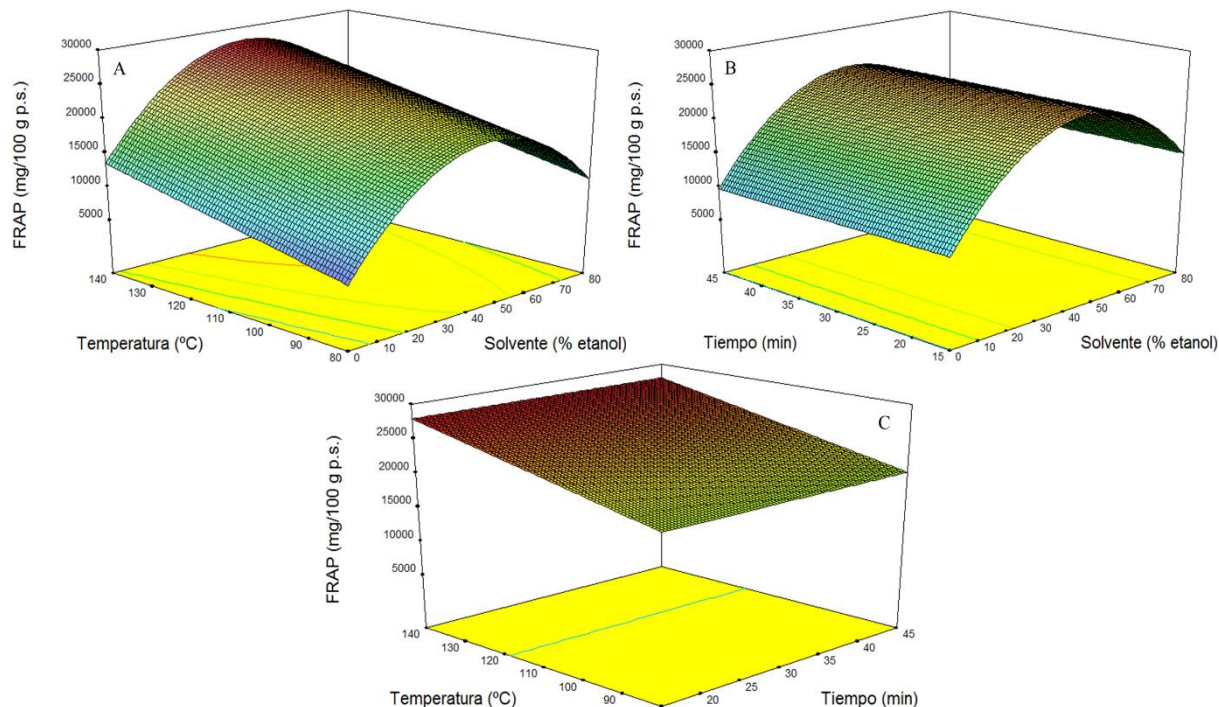
**Figura 4.4.** Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción con el sistema Soxtec en piel de rambután desecada para el contenido de compuestos fenólicos totales (mg ác. gálico/kg p.s.). Interacción entre la temperatura y el solvente a los 30 minutos de extracción (A); entre el tiempo y el solvente a 110°C (B); y entre la temperatura y el tiempo al 40% de etanol (C).



**Figura 4.5.** Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción con el sistema Soxtec en piel de rambután desecada para el contenido de flavonoides totales (mg catequina/kg p.s.). Interacción entre la temperatura y el solvente a los 30 minutos de extracción (A); entre el tiempo y el solvente a 110°C (B); y entre el tiempo y la temperatura al 40% de etanol (C).



**Figura 4.6.** Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción con el sistema Soxtec en piel de rambután desecada para la capacidad antioxidante por el método DPPH (mg Trolox/kg p.s.). Interacción entre la temperatura y el solvente a los 30 minutos de extracción (A); entre el tiempo y el solvente a 110°C; y entre el tiempo y la temperatura al 40% de etanol (C).



**Figura 4.7.** Gráficas de superficie 3D elaboradas a partir del modelo de extracción con el sistema Soxtec en piel de rambután desecada para la capacidad antioxidante por el método FRAP (mg Trolox/kg p.s.). Interacción entre la temperatura y el solvente a los 30 minutos de extracción (A); entre el tiempo y el solvente a 110°C; y entre el tiempo y la temperatura al 40% de etanol (C).

Por otro lado, la optimización para todas las variables dependientes en conjunto, según el modelo, y los valores de las variables independientes que hacen máximas estas respuestas se muestran en la *tabla 4.7.*, así como los resultados experimentales hallados tras la extracción en dichas condiciones determinadas. Puede observarse que al validar el modelo, los valores reales obtenidos fueron muy similares a los estimados por este, indicando la capacidad de predicción del mismo dentro de los rangos ensayados.

**Tabla 4.7.** Valores teóricos de las variables independientes obtenidos para maximizar las distintas respuestas, y resultados tras la extracción experimental en las condiciones óptimas.

Ensayo	Variables independientes			Variables dependientes			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>
<b>Modelizado</b>	48,99	140,00	35,24	17.233,0	3.320,1	13.507,2	27.937,6
<b>Experimental</b>	50,00	140,00	35,00	17.287,5 ± 400,3	3.197,3 ± 186,1	12.322,0 ± 1.211,1	27.484,9 ± 940,4

X<sub>1</sub>: etanol (%); X<sub>2</sub>: temperatura (°C); X<sub>3</sub>: tiempo (min); Y<sub>1</sub>: fenoles (mg ácido gálico/100 g p.s.); Y<sub>2</sub>: flavonoides (mg catequina/100 g p.s.); Y<sub>3</sub>: capacidad antioxidante método DPPH (mg Trolox/100 g p.s.); Y<sub>4</sub>: Capacidad antioxidante método FRAP (mg Trolox/100 g p.s.). Resultados expresados en base seca de subproducto.

**Tabla 4.8.** Concentración en compuestos fenólicos y flavonoides totales de los extractos de piel de rambután obtenidos mediante el procedimiento control de homogeneización y centrifugación. Resultados expresados como la media e intervalo de confianza al 95%, en base seca de subproducto.

Ensayo	Fenoles totales (mg ác. gálico/100 g p.s.)	Flavonoides totales (mg catequina/100 g p.s.)
<b>Control (metanol)</b>	10.943,4 ± 2.228,3	1.794,9 ± 283,7
<b>Control (etanol)</b>	15.657,4 ± 3.672,4	1.743,1 ± 214,6

La *tabla 4.8.* muestra los contenidos en compuestos fenólicos y flavonoides totales de los extractos de piel de rambután obtenidos por el protocolo convencional de homogeneización a temperatura ambiente y centrifugación. Si se comparan con los resultados obtenidos en los extractos del sistema soxtec, se observa que aumentó la cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides totales extraídos en un 58 y 84%, respectivamente en el extracto control etanólico, habiendo reducido considerablemente la fracción de solvente utilizada. Sin embargo, sería necesario aplicar temperaturas elevadas (140°C) durante tiempos más prolongados, que conllevan mayor gasto energético. En resumen, habría que valorar la sostenibilidad del proceso en función de su rendimiento. Para ilustrar esta disyuntiva se tuvieron en cuenta otras alternativas, por ejemplo, maximizar la extracción de las respuestas a la mínima temperatura ensayada (80°C). De



este modo, el tiempo estimado de extracción también disminuye (26 minutos), pero la concentración de fenoles predicha por el modelo es de 13.809,8 mg ác. gálico/100 g p.s., muy por debajo del rendimiento que puede aportar este subproducto. Por otro lado, el hecho de acortar el tiempo de extracción no es muy relevante ya que cualquier proceso convencional requiere periodos mucho más amplios.

#### 4.3.1. Identificación de los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en los extractos de piel de rambután obtenidos mediante sistema Soxtec

Los polifenoles son un amplio grupo de compuestos con composición, estructura, y por lo tanto, funciones diferentes. Por ello, además de cuantificar el contenido total de los mismos, se ha intentado profundizar en la composición fenólica de los extractos de piel de rambután optimizados mediante la identificación individual por HPLC.

Los extractos optimizados se han comparado con el control obtenido por el método convencional de homogeneización y centrifugación, y con tres de los ensayos del diseño experimental (*Tabla 4.9.*).

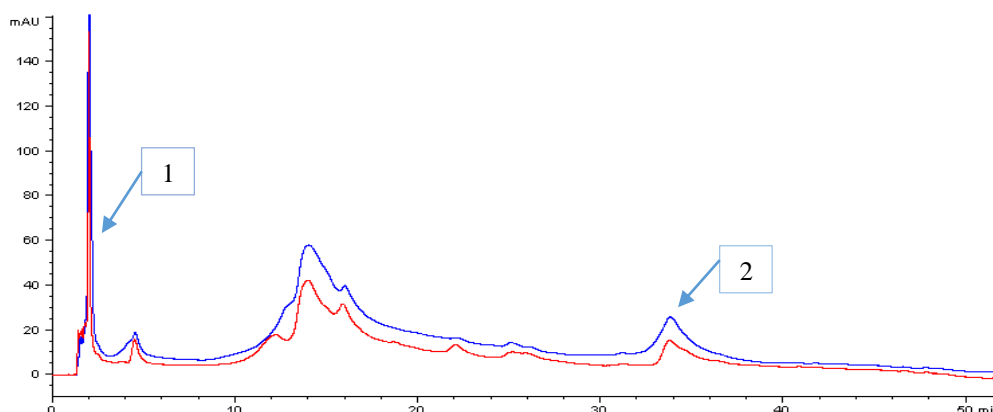
**Tabla 4.9.** Concentración de los compuestos fenólicos individuales identificados en los distintos extractos de piel de rambután desecada, obtenidos mediante el sistema Soxtec, y los controles obtenidos por el protocolo convencional. Los resultados se expresan como media e intervalo de confianza al 95% en mg/g de peso seco de residuo.

Ensayo	Condiciones extracción			Concentración ác. gálico (mg/g)	Concentración ác. elágico (mg/g)
	Solvente (%)	T <sup>a</sup> (°C)	t (min)		
<b>Control (metanol)</b>	80	20	3	Trazas	4,23 ± 0,68
<b>Control (etanol)</b>	80	20	3	1,6 ± 0,3	18,1 ± 6,1
<b>4</b>	0	140	45	0,1 ± 0,04	2,3 ± 0,9
<b>5</b>	80	140	45	1,0 ± 0,2	45,5 ± 4,9
<b>7</b>	40	140	30	0,6 ± 0,1	10,0 ± 2,6
<b>Óptimo</b>	50	140	35	1,0 ± 0,1	16,2 ± 0,3

El ácido elágico es un potente inhibidor del factor nuclear kappa B, involucrado en la patogénesis de varias enfermedades de diversa índole, como artritis reumatoide, desórdenes neurodegenerativos o cáncer (Crozier et al., 2009). Se trata de uno de los compuestos más interesantes presentes en la piel del rambután, y se puede observar en la *figura 4.8.* que, en las condiciones óptimas de extracción, se llegan a conseguir extractos con una concentración similar a los del control, reduciendo notablemente la proporción

de etanol empleada, lo que supone una mejora en la sostenibilidad del proceso.. Por otro lado, si se emplea una proporción de etanol:agua del 80% con elevada temperatura y tiempos más prolongados el contenido en ácido elágico casi se triplica, pero supondría un gasto energético mayor y aumentaría el perjuicio para el medio ambiente, que son los principales factores que hay que valorar en estas estrategias de aprovechamiento de subproductos.

Por otro lado, al contrario que los resultados obtenidos por otros autores, cabe destacar que se obtuvieron extractos con una concentración considerablemente mayor de fenoles totales, y de los dos ácidos fenólicos individuales más prevalentes, ácido gálico y ácido elágico, en los extractos que se empleó etanol como solvente, tomando como referencia los extractos metanólicos.



**Figura 4.8.** Cromatograma a 280 nm de los compuestos fenólicos presentes en la piel de rambután extraídos por el sistema Soxtec en condiciones óptimas (rojo), y por el procedimiento control de homogeneización y centrifugación (azul). 1: ácido gálico; 2: ácido elágico.

#### **4.3.2. Determinación de la capacidad inhibitoria de la oxidación en aceite de oliva de los extractos de piel de rambután por el sistema Soxtec**

Se ha demostrado que los extractos de piel de rambután desecada poseen un alto contenido en compuestos fenólicos y flavonoides, y presentan una elevada capacidad secuestrante del radical DPPH y de reducción férrica. Con el fin de verificar su posible efecto protector se realizó una prueba *in vivo* para determinar el grado de prevención que estos extractos podían ejercer sobre la oxidación de una matriz grasa de origen vegetal como es el aceite de oliva.

Los aceites de oliva virgen extra son en sí mismos alimentos ricos en compuestos bioactivos como fenoles y flavonoides totales,  $\alpha$ -tocoferol, o  $\beta$ -caroteno, que están estrechamente relacionados con la capacidad antioxidante y la estabilidad del aceite durante su vida útil (Lee et al., 2007). Por esta razón se estudió el efecto de los extractos sobre aceite de oliva virgen, que al ser de una calidad composicional inferior, se previó que el efecto del extracto fuera mayor. Tras el análisis de la estabilidad del aceite en condiciones aceleradas con el equipo Rancimat, se determinó el periodo de inducción (PI), a partir del cual los aceites pierden su estabilidad, y mediante la relación  $PI_{\text{muestra}}/PI_{\text{control}}$ , se estableció el factor de protección (FP), donde valores superiores a 1 indican protección frente a la autoxidación.

El periodo de inducción de las muestras que contenían extracto ( $PI_{\text{óptimo}}=6,75$ , y  $PI_{\text{control}}=5,38$ ) aumentó respecto a los blancos, por lo que, a pesar de la pequeña cantidad de extracto añadida a las muestras (0,003 mg/mL), tanto el extracto control (FP=1,05), como el óptimo obtenido por el sistema Soxtec (FP=1,14), presentaron un efecto positivo en la protección frente a la oxidación lipídica del aceite de oliva virgen. Chandrasekara y Shahidi (2011) obtuvieron extractos de anacardo con un factor de protección frente a la oxidación de los aceites de hasta 1,59, pero con una concentración final de 0,5 mg de extracto/mL, es decir, mucho mayor a la añadida en nuestras muestras. Estudios recientes llevados a cabo en el grupo de investigación, también presentan resultados positivos frente a la inhibición de la oxidación lipídica al comparar los factores de protección de distintos extractos procedentes del aclareo de frutas de hueso con el del antioxidante sintético BHT (FP=2,1) cuando se añade a razón de 0,7 mg/mL de aceite (Redondo, 2014).

A la vista de los resultados, y teniendo en cuenta el creciente interés de los consumidores por ingredientes alimentarios de origen natural, se puede concluir que los extractos de la piel de rambután obtenidos por el sistema Soxtec pueden ser una alternativa práctica al empleo de sustancias antioxidantes sintéticas como BHT, BHA o TBHQ, ampliamente utilizadas para controlar la oxidación de los lípidos, pero cuya seguridad se ha está cuestionando en los últimos años (Chandrasekara y Shahidi, 2011).

## 5. CONCLUSIONES

### Primera

De entre los extractos metanólicos obtenidos de los subproductos de frutas tropicales estudiados, piel y hueso de mango, pericarpio de cacao, piel y corona de piña, piel de plátano, piel de pitahaya roja, y piel de rambután, destacan el hueso de mango y la piel de rambután por su elevado contenido en compuestos fenólicos, especialmente este último, con concentraciones cinco veces superior al del resto de subproductos.

### Segunda

En orden descendente, los subproductos con un mayor contenido en flavonoides fueron la piel de rambután, la piel de plátano y mango, y el hueso de mango, destacando la piel de plátano por la alta relación de flavonoides respecto a los compuestos fenólicos totales.

### Tercera

La actividad antioxidante determinada por el método DPPH fue significativamente mayor en los extractos metanólicos de hueso de mango y piel de rambután, coincidiendo estos extractos con los de mayor contenido fenólico.

### Cuarta

La identificación de los fenoles individuales por cromatografía líquida de alta resolución muestra que el ácido elágico es el compuesto más prevalente, detectándose en cinco de siete de los subproductos analizados, destacando por su concentración en el hueso de mango, la piel de pitahaya roja, y la piel de rambután.



### **Quinta**

El rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos totales, ácido gálico y ácido elágico aumenta considerablemente empleando etanol como solvente en comparación con el uso de metanol.

### **Sexta**

La modelización mediante la metodología de superficie de respuesta de la extracción de compuestos fenólicos totales de la piel de rambután con el sistema soxtec, y empleando etanol como solvente, indica que el mayor rendimiento del proceso se obtiene con 50% de etanol, 140°C, y 35 minutos.

### **Séptima**

La extracción de ácido elágico de la piel de rambután es máxima a una concentración de etanol del 80%, a 140°C durante 45 minutos. Sin embargo, en aras de un proceso medioambientalmente más sostenible, se puede reducir la concentración de etanol al 50%, y el tiempo de extracción a 35 minutos, obteniendo concentraciones aceptables de este compuesto.

### **Octava**

El extracto etanólico de la piel del rambután, a concentraciones diez veces menores que el antioxidante sintético butil hidroxil tolueno, muestra una inhibición considerable de la rancidez oxidativa del aceite de oliva virgen, demostrando el interés de este residuo para la obtención de extractos naturales con aplicaciones en la industria alimentaria.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Abbasi, H., Rezaei, K., Emamdjomeh, Z., y Mousavi, S. M. E. (2008). Effect of various extraction conditions on the phenolic contents of pomegranate seed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 435-440.
- Abdalla, A. E. M., Darwish, S. M., Ayad, E. H. E., y El-Hamahmy, R. M. (2007). Egyptian mango by-product 1. Compositional quality of mango seed kernel. *Food Chemistry*, 103(4), 1134-1140.
- Abraham, E., Ramachandran, S., y Ramalingam, V. (2007). Biogas: Can It Be an Important Source of Energy? *Environmental Science and Pollution Research - International*, 14(1), 67-71.
- Actis-Goretta, L., Ottaviani, J. I., y Fraga, C. G. (2006). Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 229-234.
- Ajila, C. M., Aalami, M., Leelavathi, K., y Rao, U. J. S. P. (2010). Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1), 219-224.
- Ajila, C. M., Bhat, S. G., y Prasada Rao, U. J. S. (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, 102(4), 1006-1011.
- Ajila, C. M., Naidu, K. A., Bhat, S. G., y Rao, U. P. (2007). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, 105(3), 982-988.
- Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A.-L., y Haroutounian, S. A. (2010). Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Research International*, 43(3), 805-813.
- Ayala-Zavala, J. F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., y González-Aguilar, G. A. (2010). Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh-Cut Fruits Using Their Own Byproducts: Looking for Integral Exploitation. *Journal of Food Science*, 75(8), R175-R181.
- Batista, L. (2009). Guía técnica el cultivo de cacao: CEDAF.
- Boussetta, N., Vorobiev, E., Le, L. H., Cordin-Falcimaigne, A., y Lanoiselle, J. L. (2012). Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds. *Lwt-Food Science and Technology*, 46(1), 127-134.
- Boussetta, N., Vorobiev, E., Reess, T., De Ferron, A., Pecastaing, L., Ruscassie, R., y Lanoiselle, J. L. (2012). Scale-up of high voltage electrical discharges for polyphenols extraction from grape pomace: Effect of the dynamic shock waves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 129-136.
- Box, G. E. P., y Wilson, K. B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology*, 13(1), 1-45.
- Calderón, E. L. (2012). Response Surface Method and Linear Programming in the development of mixed nectar of acceptability high and minimum cost.
- Cam, M., y Icyer, N. C. (2015). Phenolics of pomegranate peels: extraction optimization by central composite design and alpha glucosidase inhibition potentials. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 52(3), 1489-1497.
- Chandrasekara, N., y Shahidi, F. (2011). Antioxidative potential of cashew phenolics in food and biological model systems as affected by roasting. *Food Chemistry*, 129(4), 1388-1396.
- Chunglok, W., Utaipan, T., Somchit, N., Lertcanawanichakul, M., y Sudjaroen, Y. (2014). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Non-Edible Parts of Selected Tropical Fruits. *Sains Malaysiana*, 43(5), 689-696.
- Contreras-Calderon, J., Calderon-Jaimes, L., Guerra-Hernandez, E., y Garcia-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44(7), 2047-2053.
- Correia, R. T. P., Borges, K. C., Medeiros, M. F., y Genovese, M. I. (2012). Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. *Food Science and Technology International*, 18(6), 539-547.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., y Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001-1043.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., y Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818-1892.
- de Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Silva, C. A., Henriques Bechara, E. J., de Barros, M. P., Mano, C. M., y Fonseca Goularta, M. O. (2009). Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry*, 115(2), 469-475.

- Dorta, E., González, M., Lobo, M. G., Sánchez-Moreno, C., y de Ancos, B. (2014). Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food Research International*, 57(0), 51-60.
- Du, G., Li, M., Ma, F., y Liang, D. (2009). Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in Actinidia fruits. *Food Chemistry*, 113(2), 557-562.
- FAOSTAT. (2012). Food and Agriculture Organization Statistics, [www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org)
- Fennema, O. R. (2000). *Química de los alimentos*: Acribia.
- García-Mendoza, M. P., Paula, J. T., Paviani, L. C., Cabral, F. A., y Martínez-Correa, H. A. (2015). Extracts from mango peel by-product obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized solvent processes. *Lwt-Food Science and Technology*, 62(1), 131-137.
- Gharekhani, M., Ghorbani, M., y Rasoulnejad, N. (2012). Microwave-assisted extraction of phenolic and flavonoid compounds from eucalyptus camaldulensis dehn leaves as compared with ultrasound-assisted extraction. *Latin American Applied Research*, 42(3), 305-310.
- Gong, Y., Hou, Z., Gao, Y., Xue, Y., Liu, X., y Liu, G. (2012). Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 90(C1), 9-16.
- Gonzalez-Centeno, M. R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rossello, C., y Femenia, A. (2014). Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) - A response surface approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2176-2184.
- Gonzalez-Montelongo, R., Gloria Lobo, M., y Gonzalez, M. (2010). Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, 119(3), 1030-1039.
- González-Montelongo, R., Lobo, M. G., y González, M. (2010). The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Separation and Purification Technology*, 71(3), 347-355.
- Griffin, S. P., y Bhagooli, R. (2004). Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 302(2), 201-211.
- Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., y Brunton, N. P. (2011). Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chemistry*, 126(1), 339-346.
- Iacopini, P., Camangi, F., Stefani, A., y Sebastiani, L. (2010). Antiradical potential of ancient Italian apple varieties of Malus x domestica Borkh. in a peroxynitrite-induced oxidative process. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 518-524.
- Ignat, I., Volf, I., y Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Jacob, J. K., Hakimuddin, F., Paliyath, G., y Fisher, H. (2008). Antioxidant and antiproliferative activity of polyphenols in novel high-polyphenol grape lines. *Food Research International*, 41(4), 419-428.
- Jahurul, M. H. A., Zaidul, I. S. M., Ghafoor, K., Al-Juhaimi, F. Y., Nyam, K.-L., Norulaini, N. A. N., . . . Mohd Omar, A. K. (2015). Mango (*Mangifera indica* L.) by-products and their valuable components: A review. *Food Chemistry*, 183(0), 173-180.
- Kelly, G. S. (1996). Bromelain: A literature review and discussion of its therapeutic applications. *Alternative Medicine Review*, 1(4), 243-257.
- Khonkarn, R., Okonogi, S., Ampasavate, C., y Anuchapreeda, S. (2010). Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2122-2129.
- Kim, H., Moon, J. Y., Kim, H., Lee, D.-S., Cho, M., Choi, H.-K., . . . Cho, S. K. (2010). Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. *Food Chemistry*, 121(2), 429-436.
- Kong, K.-W., Ismail, A. R., Tan, S.-T., Prasad, K. M. N., y Ismail, A. (2010). Response surface optimisation for the extraction of phenolics and flavonoids from a pink guava puree industrial by-product. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(8), 1739-1745.
- Kong, K. W., Ismail, A., Tan, C. P., y Rajab, N. F. (2010). Optimization of oven drying conditions for lycopene content and lipophilic antioxidant capacity in a by-product of the pink guava puree industry using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 43(5), 729-735.

- Kulkarni, S. G., y Vijayanand, P.** (2010). Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* L.). *Lwt-Food Science and Technology*, 43(7), 1026-1031.
- Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Ruperez, P., Goya, L., y Bravo, L.** (2007). Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 104(3), 948-954.
- Lee, O.-H., Kim, Y.-C., Kim, K.-J., Kim, Y.-C., y Lee, B.-Y.** (2007). The effects of bioactive compounds and fatty acid compositions on the oxidative stability of extra virgin olive oil varieties. *Food Science and Biotechnology*, 16(3), 415-420.
- Liu, G., Xu, X., Hao, Q., y Gao, Y.** (2009). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction optimization of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using response surface methodology. *Lwt-Food Science and Technology*, 42(9), 1491-1495.
- Llorach, R., Tomas-Barberan, F. A., y Ferreres, F.** (2004). Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5109-5116.
- Malta, L. G., Tessaro, E. P., Eberlin, M., Pastore, G. M., y Liu, R. H.** (2013). Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. *Food Research International*, 53(1), 417-425.
- Mamboya, E.** (2012). Papain, a plant enzyme of biological importance. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8, 99-104.
- Marinova, D., Ribarova, F., y Atanassova, M.** (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40(3), 255-260.
- Martín Cerdeño, V. J.** (2011). Demanda de frutas y hortalizas en España. *Distribución y consumo*(119), 16-43.
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., y Viuda-Martos, M.** (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49(1), 39-45.
- Mirabella, N., Castellani, V., y Sala, S.** (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65(0), 28-41
- Mohdaly, A. A. A., Hassanien, M. F. R., Mahmoud, A., Sarhan, M. A., y Smetanska, I.** (2013). Phenolics Extracted from Potato, Sugar Beet, and Sesame Processing By-Products. *International Journal of Food Properties*, 16(5), 1148-1168.
- Mohdaly, A. A. A., Sarhan, M. A., Smetanska, I., y Mahmoud, A.** (2010). Antioxidant properties of various solvent extracts of potato peel, sugar beet pulp and sesame cake. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), 218-226.
- Monier, V.** (2011). *Preparatory study on food waste across EU 27*. [S.l.]: European Commission.
- Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., Vargas, M. d. L. V. y., . . . Sauri-Duch, E.** (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 152(0), 508-515.
- Moongkarndi, P., Kosem, N., Kaslungka, S., Luanratana, O., Pongpan, N., y Neungton, N.** (2004). Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(1), 161-166.
- Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S., y Chowwanapoonpohn, S.** (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103(3), 839-846.
- Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. A., y Adenan, I.** (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100(4), 1523-1530.
- Palanisamy, U., Ming, C. H., Masilamani, T., Subramaniam, T., Teng, L. L., y Radhakrishnan, A. K.** (2008). Rind of the rambutan, *Nephelium lappaceum*, a potential source of natural antioxidants. *Food Chemistry*, 109(1), 54-63.
- Park, Y.-S., Cvikrová, M., Martincová, O., Ham, K.-S., Kang, S.-G., Park, Y.-K., . . . Gorinstein, S.** (2015). In vitro antioxidative and binding properties of phenolics in traditional, citrus and exotic fruits. *Food Research International*, 74(0), 37-47.
- Perino-Issartier, S., Zill e, H., Abert-Vian, M., y Chemat, F.** (2011). Solvent Free Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Food By-Products. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1020-1028.
- Prasad, K. N., Hassan, F. A., Yang, B., Kong, K. W., Ramanan, R. N., Azlan, A., y Ismail, A.** (2011). Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food Chemistry*, 128(4), 1121-1127.

- Prasad, K. N., Kong, K. W., Ramanan, R. N., Azlan, A., y Ismail, A.** (2012). Determination and Optimization of Flavonoid and Extract Yield from Brown Mango using Response Surface Methodology. *Separation Science and Technology*, 47(1), 73-80.
- Redondo, D.** (2014). El aclareo en frutos de hueso: una nueva fuente de compuestos de interés funcional y tecnológico. Universidad de Zaragoza.
- Ribeiro da Silva, L. M., Teixeira de Figueiredo, E. A., Pontes Silva Ricardo, N. M., Pinto Vieira, I. G., de Figueiredo, R. W., Brasil, I. M., y Gomes, C. L.** (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 143, 398-404.
- Russo, A., Cardile, V., Lombardo, L., Vanella, L., Vanella, A., y Garbarino, J. A.** (2005). Antioxidant activity and antiproliferative action of methanolic extract of Geum quellyon Sweet roots in human tumor cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(3), 323-332.
- Schuldt, M.** (2006). *Lombricultura: teoría y práctica*: Mundi-Prensa Libros.
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A.** (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Spigno, G., Tramelli, L., y De Faveri, D. M.** (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200-208.
- Sulaiman, S. F., Yusoff, N. A. M., Eldeen, I. M., Seow, E. M., Sajak, A. A. B., Supriatno, y Ooi, K. L.** (2011). Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa* sp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 1-10.
- Tabaraki, R., Heidarizadi, E., y Benvidi, A.** (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 98, 16-23.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., y Byrne, D. H.** (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669-675.
- Thitilertdech, N., Teerawutgulrag, A., y Rakariyatham, N.** (2008). Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 2029-2035.
- Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., Cremin, P., Waterhouse, A. L., Hess-Pierce, B., y Kader, A. A.** (2001). HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4748-4760.
- Torres, A. C., Galván, D. F., Sauco, V. G., y Agrarias, I. C. d. I.** (1997). *Guía descriptiva de cultivares de mango*: Gobierno de Canarias, Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Wollgast, J., y Anklam, E.** (2000a). Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Research International*, 33(6), 449-459.
- Wollgast, J., y Anklam, E.** (2000b). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6), 423-447.
- Yapo, B. M., Besson, V., Koubala, B. B., y Koffi, K. L.** (2013). Adding Value to Cacao Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source. *American Journal of Food and Nutrition*, 1(3), 38-46.
- Yepes, S. M., Montoya Naranjo, L. J., y Orozco Sánchez, F.** (2008). Valorización de residuos agroindustriales- frutas - en Medellín y el sur del valle del Aburrá, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 61, 4422-4431.
- Zhang, H., Tang, B., y Row, K. H.** (2014). A green deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted method to extract astaxanthin from shrimp byproducts. *Analytical Letters*, 47(5), 742-749.